



Química Clínica

Teoría, análisis y correlación

TERCERA EDICIÓN

Editores de la tercera edición en inglés:

LAWRENCE A. KAPLAN

Director, Laboratorio de Química Clínica y Toxicología Bellevue Hospital
Profesor clínica, Departamento de Patología Universidad de Nuevo York
Nuevo York, Nuevo York

AMADEO J. PESCE

Director, Laboratorio Adams County Hospital West Union, Ohio
Director, Laboratorio Drake Hospital Center Cincinnati, Ohio
Profesor, Departamento de Patología y Medicina de Laboratorio
Universidad de Cincinnati
Cincinnati, Ohio

Editor de los métodos:

Steven C. Kazamierczak

Director, Laboratorio Química Clínica
Departamento de Patología y Medicina de Laboratorio
Universidad del Este de Carolina Escuela de Médico
Greenville, Carolina del Norte

Editor de la edición español:

JAVIER ORTEGA-CESEÑA

Titulo del original en inglés CLINICAL CHEMISTRY Theory Analysis and Correlation
Copyright © 1996 The C. V. Mosby Company St. Louis, Missouri USA



CONSEJO EDITORIAL

Gerado Barrachina
ARGENTINA

Manuel Morejon-Campa
CUBA

Andreas Rothstein
COLOMBIA

Rosa Sierra-Amor
MÉXICO

Gustavo Diaz Gill
PARAGUAY

Zulema Coppes
URUGUAY

Q. F. Malega Cladera
URUGUAY

Clara S. de Grumberg
URUGUAY

Margarita Iturriza
VENEZUELA

TRADUCTORES

Danilo D'Amico Ujcich (VENEZUELA)

License in Bioanálisis
Laboratorio Metropolitano, CA
Calle A-I Urb Caurimare
Caracas, Venezuela
Capítulo 4, Técnicas Espectrales

Gerardo Barrachina, Ph.D (ARGENTINA)

Laboratorio de Análisis
French-Echevarne



French 2979 C1425AWI

Buenos Aires, Argentina

Capítulo 14, Medición de Propiedades Coligativas; Capítulo 34, Alcoholismo; Capítulo 37, Nutrición Humana; Capítulo 38, Elementos Traza; Capítulo 52, Adicción y Abuso de Substancias; Capítulo 56, Monitoreo de Drogas Terapéuticas

Carmen Beatriz Briceño (VENEZUELA)

License in Bioanálisis

Laboratorio Clínico Briceño

Barquisimeto, Venezuela

Capítulo 7, Cromatografía Gaseosa

Fernando Brites (ARGENTINA)

Departamento de Bioquímica Clínica

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Universidad de Buenos Aires

Buenos Aires, Argentina

Capítulo 53, Clasificación y Descripción de Proteínas, Lípidos e Hidratos de Carbona

Fernando Bustos (ARGENTINA)

Departamento de Bioquímica Clínica

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Universidad de Buenos Aires

Buenos Aires, Argentina

Capítulo 54, Enzimología

Tania Carreón –Valancia, Ph.D. (MEXICO)

NIOSH

Cincinnati, OH USA

Capítulo 19, Estadística de Laboratorio

Osvaldo Cascone, Ph.D. (ARGENTINA)

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Universidad de Buenos Aires

Junín 956

Buenos Aires, Argentina

Capítulo 6, Cromatografía Líquida; Capítulo 14, Medición de Propiedades Coligativas; Capítulo 56, Monitoreo de Drogas Terapéuticas

Q. F. Malega Cladera, Ph.D. (URUGUAY)

Montevideo, Uruguay

Capítulo 40, Embarazo y Desarrollo Fetal

Zulema Coppes, Ph.D. (URUGUAY)

Profesora de Bioquímica

Cátedra de Bioquímica

Facultad de Química Universidad de Uruguay

Presidente de la "Sociedad Uruguaya para la Nutrición y el Cáncer"

Montevideo, Uruguay

Capítulo 32, Diabetes Mellitus; Capítulo 35, Metabolismo del Hierro, Porphirina, y Bilirrubina; Capítulo 36, Hemoglobina; Capítulo 39, Vitaminas; Capítulo 47, Enfermedades de Origen Genético; Capítulo 48, Biología Molecular en el Laboratorio Clínico; Capítulo 49, Neoplasias



Alicia Mabel Cruz (MEXICO)

Laboratorio de Control de Calidad

IMSS

Ciudad de México, México

Capítulo 1, Principios Básicos de Laboratorio and Técnicas; Capítulo 2, Administración del Laboratorio; Capítulo 3, Origen y Control de la Variación Pre-analítica; Capítulo 16, Automation; Capítulo 17, Uso de Pruebas en la Lugar de Atención al paciente

Alicia Marcelina Diaz Garcia, Ph.D. (CUBA)

Laboratorio Bioinorganica

Facultad de Quimica

Universidad de La Habana

Zapata y G

Ciudad de la Habana

CP 10400 CUBA

Capítulo 8, Espectrómetro de Masa

Sylvia Falzoni, Ph.D. (ARGENTINA)

Laboratorio de Análisis

French-Echevarne

French 2979 C1425AWI

Buenos Aires, Argentina

Capítulo 56, Monitoreo de Drogas Terapéuticas

Mariano Fernández-Ulloa, M.D. (UNITED STATES)

Departamento de Radiación y Medicina Nuclear

Universidad de Cincinnati

Cincinnati, Ohio USA

Capítulo 44, Tiroides

Blanca Beatriz Garcá, Ph.D. (COLOMBIA)

Centro Médico Imbanaco

Santiago de Cali, Bogotá, Colombia

Capítulo 57, Análisis de Orina

Gustavo Díaz-Gill

Profesor de Inmunología

Universidad Nacional de Asunción

Asunción, Paraguay

Capítulo 10, Electroforesis; Capítulo 11, Reacciones Inmunológicas

Aída Hernández-Tobías (MEXICO)

Laboratorio Clínico

Médica Sur Puente de Piedra

150 Tlalpan

4050 Mexico DF Mexico

Capítulo 5, Cromatografía, Teoría y Práctica; Capítulo 15, Electroquímica

Margarita Iturriza, Ph.D (VENEZUELA)

Laboratorio Metropolitano

CA Calle A-I Urb Caurimare

Caracas, Venezuela



*Capítulo 4, Técnicas Espectrales; Capítulo 25, Control para Base-ácido y Desordenes con Base-ácido;
Capítulo 31, Enfermedades Cardíaca y Muscular*

Gladys Laverde de Arbelaez

Laboratorio de Investigación Hormonal
LIH Ltda
Bogotá, D.C. Columbia
Capítulo 43, Endocrinología General

Leticia Madalena (ARGENTINA)

Departamento de Bioquímica Clínica
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Universidad de Buenos Aires
Buenos Aires, Argentina
Capítulo 53, Clasificación y descripción de Proteínas, Lípidos e Hidratos de Carbona

Midori Mitsui, Ph.D. (PARAGUAY)

Department of Immunology
University of California at Los Angeles
Los Angeles, California USA
Capítulo 10, Electroforesis; Capítulo 11, Reacciones Inmunológicas

Lic. Manuel Morejon-Campa, Ph.D.

Jefe Departamento Diagnosticadores
Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos
Apdo Postal 16 065 CP 11 600
Ciudad de La Habana, Cuba
Capítulo 24, Fisiología y Fisiopatología del Agua y los Electrolitos Orgánicos

Gustavo Negri, Ph.D (ARGENTINA)

Profesor Titular Departamento de Bioquímica Clínica
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Universidad de Buenos Aires
Buenos Aires, Argentina
Capítulo 54, Enzimología

Javier Ortega-Ceseña (MEXICO)

Department of Environmental Health
University of Cincinnati
Cincinnati, OH 45267 USA
*Capítulo 12, Técnicas Inmunoquímicas; Capítulo 13, Principios de los Ensayos de Unión Competitiva;
Capítulo 44, La Tiroides; Capítulo 50, Evaluación de Laboratorio del Receptor y del Donante de
Transplante; Capítulo 51, Toxicología; Capítulo 55, Isoenzimas e Isoformas*

Marco Pizzolato, Ph.D. (ARGENTINA)

Profesor Titular Departamento de Bioquímica Clínica
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Universidad de Buenos Aires
Buenos Aires, Argentina
*Capítulo 53, Clasificación y Descripción de Proteínas, Lípidos e Hidratos de Carbona; Capítulo 54,
Enzimología*

Maria Teresa Ramirez-Iglesias (MEXICO)



Instituto Nacional de Ciencias
Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”
Vasco de Quiroga 15 Tlalpan
14050 Mexico, DF Mexico
Capítulo 29, La Pancreática: Función y Patología Química

Guillermo Benito Robles-Diaz (MEXICO)

Instituto Nacional de Ciencias
Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”
Vasco de Quiroga 15 Tlalpan
14050 Mexico Df Mexico
Capítulo 29, La Pancreática: Función y Patología Química

Andreas Rothstein, B.S.

Laboratorio Clinico Andreas Rothstein
Bogotá, D.C. Columbia
Capítulo 22, Evaluación de Metodos; Capítulo 27, Función Hepática

Gerardo Sanchez (VENEZUELA)

License in Bioanálisis
Laboratory Sanchez Font
Caracas, Venezuela
Capítulo 25, Control para Base-ácido y Desordenes con Base-ácido

Clara Schcolnik de Grumberg, Ph.D.

Montevideo, Uruguay
Capítulo 23, Interferencias en el Análisis Chemical; Capítulo 26, Función Renal; Capítulo 30, Función Gastrointestinales y Enfermadad Digestivas; Capítulo 33, Enfermadades Coronario Arteriales y Desórdenes del Metabolismo Lipídico; Capítulo 46, Hipertensión

Saúl López-Silva, Ph.D. (MEXICO)

Centro de Innovación y Desarrollo Tecnológico en Salud
Facultad de Medicina Universidad Autónoma de Guerrero, Mexico
Capítulo 18, Systems Información del Laboratorio, Capítulo 41, Líquidos Biológicos Extravasculares; Capítulo 42, Sistema Nervioso

Rosa Sierra-Amor, Ph.D. (MEXICO)

Labatorio de Ósea Metabolism
Hospital del Niños
Cincinnati, Ohio USA
Capítulo 17, Uso de Preuas en la Lugar de Atención al Paciente; Capitulo 28, Enfermadad Ósea

Elsa Velezquez, M.D. (PARAGUAY)

Asunción, Paraguay
Capítulo 45, Las Gónadas

Viviana Yapur (ARGENTINA)

Departamento de Bioquímica Clínica
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Universidad de Buenos Aires
Buenos Aires, Argentina
Capítulo 54, Enzimologia



Fabiola Zambrano de Cajiao (COLUMBIA)

Universidad Nacional de Columbia

Bogotá, Columbia

Capítulo 20, Intervalos de Referencia y Límites de Decisión Clínicos; Capítulo 21, Control de la Calidad en el Laboratorio Clínico

REVISORES

Ignacio Arribas, MD, PhD

Medical Staff

Department of Análisis Clínicos

Hospital Universitario Príncipe de Asturias

Alcalá de Henares

Madrid, España

Capítulo 24, Fisiología y Fisiopatología del Agua y los Electrolitos Orgánicos; Capítulo 25, Control del Equilibrio ácido-base y Desórdenes del Equilibrio ácido-base; Capítulo 28, Enfermedad Ósea; Capítulo 29, El páncreas: Función y Patología Química; Capítulo 30, Función Gastrointestinal y Enfermedades Digestivas

Carlos Calvo, Ph.D.

Facultad de Farmacia

Universidad de Concepción

Concepción, Chile

Capítulo 26, Función Renal; Capítulo 33, Enfermedades Coronario Arteriales y Desórdenes del Metabolismo Lipídico; Capítulo 36, Hemoglobina

Fernando Cava, Ph.D.

Area de Laboratorio

Fundacion Hospital Alcorcon

Madrid, España

Capítulo 17, Uso de Preuas en la Lugar de Atención Appaciente; Capítulo 18, Sistemas de Información del Laboratorio; Capítulo 48, Biología Molecular en el Laboratorio Clínico

Zulema Coppes, Ph.D.

Facultad de Química Clínica

Universidad de Uruguay

Montevideo, Uruguay

Capítulo 28, Enfermedad Ósea; Capítulo 31, Enfermedades Cardíaca y Muscular; Capítulo 34, Alcoholismo

Maria Carmen Herrero, Ph.D.

Area de Laboratorio

Fundacion Hospital Alcorcon

Madrid, España

Capítulo 18, Sistemas Información del Laboratorio; Capítulo 19, Estadística de Laboratorio

Alberto Delgado-Iribarren, Ph.D.

Area de Laboratorio

Fundacion Hospital Alcorcon

Madrid, España

Capítulo 56, Monitoreo de Drogas Terapéuticas; Capítulo 52, Adicción y Abuso de Substancias



José Manuel Gasalla

Foundation Hospital Alcorcón

Associate Professor

University "Rey Juan Carlos I"

Madrid, España

Capítulo 12, Principales de Ensayos de Fijación Competitiva; Capítulo 44, Tiroides; Capítulo 45, Las Gonadas; Capítulo 48, Biología Molecular

Blanca Beatriz Garcíá, Ph.D.

Centro Médico Imbanaco

Santiago de Cali, Bogatá

Capítulo 40, Embarazo y Develomente Fetal

Maylor Graham (MEXICO)

Atlanta, Georgia, USA

Capítulo 1, Principios Básicos de Laboratorio and Técnicas; Capítulo 2, Adminisración del Laboratorio;

Capítulo 3, Origen y Control de la Variación Pre-analítica

Maria Luisa Casas Losada

Facultativo Especialista Análisis Clínicos

Area de Laboratorio

Fundación Hospital Alcorcón

Madrid, España

Capítulo 11, Reacciones Inmunológicas; Capítulo 34, Alcoholismo; Capítulo 48, Biología Molecular

Emilia Martinez-Miranda (MEXICO)

CARPERMOR

Alfonso Herrera 75 Col. San Rafael

06470 Mexico, DF Mexico

J. Manuel Moreno, Ph.D.

Area de Laboratorio

Fundacion Hospital Alcorcon

Madrid, España

Capítulo 10, Electroforesis

Lic. Manuel Morejon-Campa, Ph.D.

Jefe Departamento Diagnosticadores

Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos

Apdo Postal 16 065 CP 11 600

Ciudad de La Habana, Cuba

Capítulo 8, Mass Spectrometry; Capítulo 21, Control de Calidad; Capítulo 36, Hemoglobina; Capítulo

Capítulo 37, Nutritión Humana

J. Carlos Moyano, M. D.

Servicio Análisis Clínicos

Hospital Los Montalvos

Salamanca, España

Capítulo 43, Endocrinologia General

José A. Navajo, Ph.D.

Salamanca Laboratorio Clinico



Salamanca, España

Capítulo 4, Técnicas Espectrales

Marco Pizzolato, Ph.D. (ARGENTINA)

Profesor Titular

Departamento de Bioquímica Clínica

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Universidad de Buenos Aires

Buenos Aires, Argentina

Capítulo 27, Función Hepática

Andreas Rothstein, B.S.

Laboratorio Clinico Andreas Rothstein

Bogotá, Columbia

Capítulo 32, Diabetes Mellitus

Saúl López-Silva, Ph.D. (MEXICO)

Centro de Innovación y Desarrollo Tecnológico en Salud

Facultad de Medicina

Universidad Autónoma de Guerrero, Mexico

Capítulo 22, Evaluación de Metodos

Araceli Sierra-Amor (MEXICO)

Laboratorios LAQUIMS S.A. de C.V.

Ave. Washington 312

91940 Veracruz, Ver. Mexico

José F. Valverde, M.D.

Fundación Hospital de Alcorcon

Madrid, España

Capítulo 19, Estadística para Laboratorio

Prefacio de CD-ROM

Esta traducción de nuestro libro de texto, "Clinical Chemistry: theory, analysis and correlation", fue impulsada por nuestra visita a Paraguay y Uruguay en 1998. Durante esa visita extraordinaria, advertimos que los químicos clínicos y estudiantes en América Latina aún estaban usando la antigua traducción en español de la primera edición de nuestro libro. Desde luego, la vieja versión del libro no respondía de manera adecuada a las demandas de la química clínica avanzada que se practica en estos países. Además, muchos de nuestros colegas de América Latina preguntaban sobre una nueva traducción. Por lo tanto, decidimos realizar una Edición en Español de la tercera edición de nuestro libro de texto (publicada en 1996).

Nuestros objetivos para la nueva edición en español eran que ésta fuese accesible a los estudiantes y que se pudiera actualizar más fácilmente que el tradicional libro de texto. Para alcanzar dichos objetivos optamos por publicarlo en una versión electrónica. Esto reduce el costo considerablemente al eliminar la impresión, almacenamiento y gastos de envío. Además, la publicación electrónica nos permite crear nuevas versiones actualizadas del libro. Por



ejemplo, la cuarta edición en inglés de "Clinical Chemistry: theory, analysis, and correlation" se publicará aproximadamente dentro de un año. La versión electrónica de la cuarta edición en español estará disponible probablemente a finales de 2001.

Elegimos publicar el libro en el formato Folio(Infobase debido a que dicho formato proporciona tres ventajas al usuario: (1) permite una recuperación extraordinariamente rápida de información mediante herramientas de búsqueda eficaces, (2) ofrece al usuario la capacidad de imprimir fácilmente las páginas deseadas y (3) permite confeccionar un perfil de información a la medida del usuario. La interfase de Folio es usada comúnmente en publicaciones electrónicas y en la red o "web". Todos los programas requeridos para leer, imprimir y modificar la Infobase están incluidos en el CD-ROM.

La producción de esta edición en CD-ROM de "Clinical Chemistry: theory, analysis and correlation" ha sido un proyecto largo, pero fascinante. Nos ha dado la oportunidad de conocer y trabajar con un talentoso grupo de químicos clínicos del mundo de habla hispana. Estas personas proporcionaron el apoyo crucial al traducir los diversos componentes del texto original en inglés y revisar dichas traducciones. Agradecemos de manera especial y hacemos un reconocimiento a nuestro talentoso consejo editorial, quienes nos ayudaron a encontrar los numerosos colegas que participaron en este proyecto. Estos profesionales de la química clínica se enumeran, junto con los capítulos en que trabajaron. A ellos les debemos nuestra enorme gratitud.

Hacemos un reconocimiento especial a la Dra. Rosa Sierra-Amor, que reunió a un gran número de colegas de México para traducir gran parte del libro. También, deseamos reconocer a nuestro colega español, el Dr. Fernando Cava, que convenció a varios de sus colegas para que proporcionaran mucha de la revisión requerida en las traducciones.

Traducir es un proceso que plantea diversos retos ya que a menudo existen diferentes acepciones para una palabra o un término. La adopción y uso en español de términos acuñados en química clínica y disciplinas afines en cada país, también representó dificultades adicionales con las que hubo que contender. Por lo tanto, agradecemos el excelente trabajo realizado por Javier Ortega-Ceseña, que fungió como Editor general en español de esta edición.

La organización de la versión electrónica del texto y las tablas también es una tarea compleja y difícil. Agradecemos a Stefanie Rosmarin, que participó como Coordinadora de Producción, por su excelente trabajo en la realización de una gran parte del producto final.

Finalmente, agradecemos la paciencia y amor de nuestras esposas, Judith Kaplan y Anna Pesce, por apoyarnos siempre en este proyecto. Así pues, este proyecto es, en última instancia, un regalo de ellas para ustedes. Todos nosotros esperamos que disfruten este trabajo de amor.

Prefacio

3rd ed preface

Ha transcurrido más de una década desde que fue publicada la primera edición de este



libro de texto. Durante ese tiempo hemos recibido la apreciación de nuestros lectores, de la cual nos sentimos agradecidos. En esta edición de *Química Clínica* hemos modificado el contenido en respuesta tanto a las críticas constructivas que hemos recibido como a la continua evolución del campo. Los recientes cambios en la química clínica reflejan las presiones económicas para continuar las tendencias históricas a fin de incrementar la automatización y consolidación de los laboratorios, así como el fuerte efecto de las fuerzas de regulación, creando la necesidad de profesionales en química clínica que posean experiencia como administradores.

Por lo tanto ha sido agregado un nuevo capítulo sobre *Administración de Laboratorio* (capítulo 2) y se ha actualizado todo el texto que refleja las regulaciones de la CLIA '88. El capítulo de administración puede ser usado por todos los lectores, de cualquier nivel, para contener mejor con la naturaleza cada vez más regulatoria de la profesión. El nuevo capítulo *Espectrometría de Masas* (capítulo 8) refleja el uso más amplio de esta metodología. La revisión de los nuevos capítulos *Evaluación de Laboratorio del Recipiente y Donador de Trasplante* (capítulo 50) y *Adicción y Sustancias de Abuso* (capítulo 52) ayudará a los lectores a entender los cambios y el crecimiento de estas disciplinas clínicas. El usuario encontrará que casi todos los capítulos han sido revisados para incorporar los avances clínicos y técnicos más recientes. Deseamos señalar que los capítulos *Cromatografía de Líquidos* (capítulo 6), *Técnicas inmunoquímicas* (capítulo 12) y *Automatización* (capítulo 16), han sido extensamente revisados para incorporar la gran cantidad de cambios técnicos que han ocurrido en estas áreas desde la segunda edición. El capítulo 19, *Estadística para Laboratorio*, se ha escrito de nuevo para proporcionar a los estudiantes ejemplos prácticos de la aplicación de la estadística en el laboratorio clínico. El capítulo 20, *Intervalos de referencia y Límites de Decisión Clínicos*, se ha revisado para incorporar los lineamientos del NCCLS.

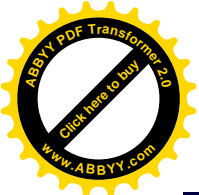
Como un cambio importante con respecto a la edición previa, hemos eliminado la sección separada de "métodos" y situamos la descripción de métodos individuales en los capítulos clínicos donde se discuten el uso de los compuestos a analizar. Este cambio nos permitió destinar más espacio para actualizar los capítulos técnicos y clínicos, y nos permitió agregar los nuevos capítulos que mencionamos anteriormente. A fin de que el estudiante tenga un fácil acceso a las revisiones de los métodos, colocamos una revisión al final del capítulo clínico correspondiente en una sección nueva e independiente, *Métodos de Análisis*.

Creemos que los instructores apreciarán esta modificación de *Química Clínica*, la cual responde a los continuos cambios en el laboratorio hacia el uso de reactivos pre-empacados, les permitirá enfocarse sobre los aspectos más importantes para los estudiantes que se inician en el campo de la química clínica.

Queremos reconocer la importante contribución del Dr. Steven C. Kazmierczak, que colaboró como editor de las áreas de métodos del libro en esta edición. Con su ayuda, hemos tratado de seleccionar los métodos que serán más útiles para la enseñanza de los principios del análisis moderno.

Continuamos con el uso abundante de las tablas de resúmenes del texto y de los cuadros y figuras con la convicción de que estos elementos representan una ayuda importante en el proceso de aprendizaje. El resumen del capítulo y el glosario de términos clave, a los cuales nuestros educadores y colegas han respondido tan favorablemente, se mantienen y se expanden a los nuevos capítulos.

El resultado de estos cambios es, por una parte, un libro de texto que será muy familiar



a quienes han usado las ediciones anteriores, permitiendo a los educadores volver a utilizar sus planes actuales de enseñanza. Por otra parte, los cambios aseguran que el estudiante aprenderá de un libro de texto que reflejará los cambios más recientes en el área. También creemos que, más que nunca, este libro puede continuar ocupando su lugar como texto de enseñanza para estudiantes de tecnología médica y como un libro de referencia actualizado para estudiantes avanzados y para individuos dedicados a la práctica de la química clínica.

Deseamos expresar nuestro agradecimiento a los directores de nuestros departamentos académicos de patología (doctores Vittorio Defendi y John Pearson, New York University, y Dr. Fenoglio-Priser, University of Cincinnati) por proporcionar una atmósfera en la cual fue posible realizar este trabajo. No podemos agradecer lo suficiente a todos nuestros autores que han aportado su valiosa experiencia al lector. Agradecemos a Judith E. Kaplan, por asegurar que el libro se presente en la manera más disfrutable al usuario, y a nuestro editor, el Sr. James F. Shanahan por su paciencia en los años pasados. Agradecemos al Dr. Myer Horowitz por su ayuda en la revisión de los manuscritos y al excelente trabajo en el procesador de textos de Georgia Coddington y Diane Gorman.

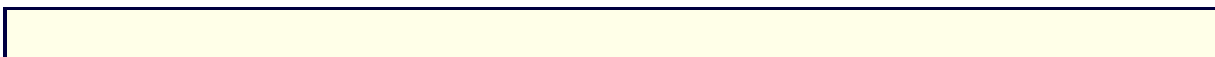
*Lawrence A. Kaplan
Amadeo J. Pesce*

Clinical Chemistry

Theory, analysis and correlation

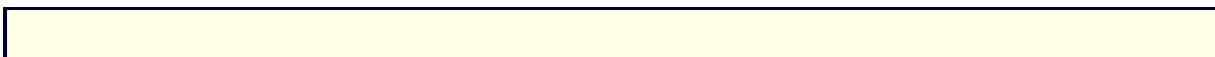
Third edition

Editors:



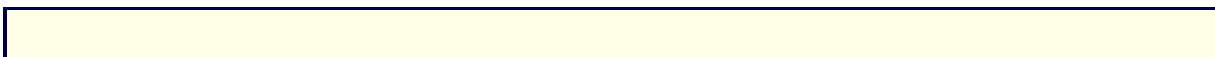
Lawrence A. Kaplan, Ph.D.

Director, Clinical Chemistry and Toxicology Laboratories,
Bellevue Hospital; Department of Pathology,
New York University
New York, New York



Amadeo J. Pesce, Ph.D.

Director, Clinical Toxicology Laboratory,
Department of Pathology and Laboratory Medicine,
University of Cincinnati Hospital
Cincinnati, Ohio



Methods editor:

Steven C. Kazmierczak, Ph.D.

Scientific Director, Clinical Chemistry,
Department of Pathology and Laboratory Medicine,
East Carolina University School of Medicine
Greenville, North Carolina



with 527 illustrations

Spanish edition of the Third edition of Clinical chemistry: theory, analysis, and correlation

Copyrighted 1999 by Pesce Kaplan Publishers, Inc

Pesce Kaplan Publishers, Inc.

Cincinnati New York

THIRD EDITION Copyright 1996 by Mosby©Year Book, Inc.

Previous editions copyrighted 1984, 1989 All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without prior written permission from the publisher. Permission to photocopy or reproduce solely for internal or personal use is permitted for libraries or other users registered with the Copyright Clearance Center, provided that the base fee of \$4.00 per chapter plus \$.10 per page is paid directly to the Copyright Clearance Center, 27 Congress Street, Salem, MA 01970. This consent does not extend to other kinds of copying, such as copying for general distribution, for advertising or promotional purposes, for creating new collected works, or for resale. Printed in the United States of America Composition by Clarinda Company Printing/binding by Maplevail Press Mosby-Year Book, Inc. 11830 Westline Industrial Drive St. Louis, Missouri 63146



Library of Congress Cataloging in Publication Data: Clinical chemistry: theory, analysis, and correlation /
[edited by] Lawrence A. Kaplan, Amadeo J. Pesce. 3rd ed. 'cm. Includes bibliographical references and
index. ISBN 0081510524304 Clinical chemistry. I. Kaplan, Lawrence A., 1944© II. Pesce, Amadeo J.
Chemistry, Clinical. QY 90 C6415 1996] RB40.C58 1996 616.07'56\Mdc20 DNLM/DLC



PRODUCTION STAFF, SPANISH EDITION

Editors: James F. Shanahan, Jennifer Roche

Developmental Editor: Sandra J. Parker

Editorial Assistant: Jennifer McCartney

Project Manager: Dana Peick

Production Editors: Carl Masthay, Blair Woodcock

Manuscript Editor: Judith E. Kaplan

Designer: Amy Buxton

Cover Designer: Frank Loose/Frank Loose Design

Manufacturing Supervisor: Betty Richmond



Contributors

Nancy W. Alcock, Ph.D.

Director, Nutrition Laboratory,
Department of Preventive Medicine and Community Health,
University of Texas Medical Branch,
Galveston, Texas

Chapter 37 Human nutrition

Chapter 38 Trace elements

David J. Anderson, Ph.D.

Associate Professor,
Director of Clinical Chemistry,
Department of Chemistry,
Cleveland State University,
Cleveland, Ohio

Chapter 6 Liquid chromatography

F. Phillip Anderson, M.S.

Department of Pathology,
Medical College of Virginia,
Richmond, Virginia

Methods: Chapter 24

Victor W. Armstrong

Georg-August-Universitat Gottingen,
Gottingen, Federal Republic of Germany

Chapter 56 Therapeutic drug monitoring (TDM): Practical aspects of TDM

Susan Bassion, Ph.D.

[affiliations unavailable]

Chapter 11 Immunological reactions

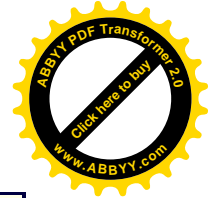
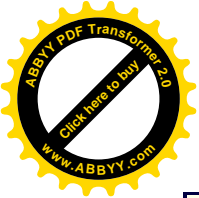
Larry D. Bowers, Ph.D.

Professor,
Department of Pathology,
Indiana University Medical Center,
Indianapolis, Indiana

Chapter 6 Liquid chromatography

John M. Brewer, Ph.D.

Professor of Biochemistry,
Department of Biochemistry,



University of Georgia,
Athens, Georgia

Chapter 10 Electrophoresis

Marge A. Brewster, Ph.D.

Professor, Departments of Pathology and Pediatrics,
University of Arkansas for Medical Sciences;
Clinical Biochemist, Arkansas Children's Hospital,
Little Rock, Arkansas

Chapter 39 Vitamins

Elizabeth Ann Byrne, M.S., C.L.S.

Assistant Professor, Biology Department,
College of Mount St. Joseph,
Mount St. Joseph, Ohio

Chapter 1 Basic laboratory principles and techniques (Part II: Calculations in clinical chemistry)

R. Neill Carey, Ph.D.

Clinical Chemist,
Department of Pathology,
Peninsula Regional Medical Center,
Salisbury, Maryland

Chapter 22 Evaluation of methods

John F. Chapman, Dr.P.H.

Associate Professor of Pathology,
University of North Carolina at Chapel Hill;
Director, Clinical Chemistry Laboratories,
University of North Carolina Hospitals,
Chapel Hill, North Carolina

Chapter 31 Cardiac and muscle disease

Chapter 40 Pregnancy and fetal development

Chapter 55 Isoenzymes and isoforms

I-Wen Chen, Ph.D.

Professor,
Department of Pathology and Laboratory Medicine,
University of Cincinnati Medical Center,
Cincinnati, Ohio

Chapter 9 Radioisotopes in clinical chemistry

Methods: Chapters 31, 39, 44

Kee Cheung, Ph.D.

University of Queensland,
Woolloongabba, Queensland, Australia

Methods: Chapter 27



David Chou, M.D.

Division of Pathology and Laboratory Medicine,
The Cleveland Clinic Foundation,
Cleveland, Ohio

Chapter 18 Laboratory information system

Robert H. Christenson, Ph.D.

Associate Professor of Pathology,
University of Maryland School of Medicine;
Director, Clinical Chemistry Laboratories,
University of Maryland Medical Center,
Baltimore, Maryland

Chapter 31 Cardiac and muscle diseases

Chapter 55 Isoenzymes and isoforms

Lawrence J. Crolla, Ph.D.

Managing Director,
World-Wide Health Care Consulting,
Surprise, Arizona

Chapter 2 Laboratory Management

Donald Davis, Ph.C.

Department of Clinical Pharmacology,
Princess Alexandra Hospital,
Woolloongabba, Queensland, Australia

Methods: Chapter 51

Laurence M. Demers, Ph.D.

Department of Pathology,
Milton S. Hershey Medical Center,
Pennsylvania State University,
Hershey, Pennsylvania

Chapter 43 General endocrinology

Joseph R. DiPersio, Ph.D.

Microbiologist,
Akron City Hospital,
Akron, Ohio

Methods: Chapter 56

Helen M. Dodds,

Department of Clinical Pharmacology,
Princess Alexandra Hospital,
Woolloongabba, Queensland, Australia

Methods: Chapter 51



Richard F. Dods, Ph.D.

Chemistry Team Leader for Curriculum Development,
Illinois Mathematics and Science Academy,
Palatine, Illinois

Chapter 32 Diabetes mellitus

David R. Dufour, M.D.

Chief, Laboratory Services,
Department of Pathology,
Veterans Affairs Medical Center,
Washington, D.C.

Chapter 3 Sources and control of preanalytical variation

Carolyn S. Feldkamp, Ph.D.

Pathology Department,
Henry Ford Hospital,
Detroit, Michigan

Chapter 12 Immunochemical techniques

Mariano Fernandez-Ulloa, M.D.

Department of Radiation/Nuclear Medicine,
University of Cincinnati,
Cincinnati, Ohio

Chapter 44 Thyroid

M. Roy First, M.D.

Professor,
Department of Internal Medicine,
University of Cincinnati Medical Center,
Cincinnati, Ohio

Chapter 26 Renal function

Chapter 50 Laboratory evaluation of the transplant recipient and donor

Donald T. Forman, Ph.D.

Professor,
Division of Laboratory Medicine,
Department of Pathology,
University of North Carolina
Chapel Hill, North Carolina

Methods: Chapter 49

Christopher S. Frings, Ph.D.

President, Chris Frings and Associates;
Clinical Professor,
Departments of Pathology and Allied Health Sciences,



University of Alabama at Birmingham,
Birmingham, Alabama
Chapter 4 Spectral techniques

Carl C. Garber, Ph.D.

Laboratory Administration,
MetPath,
Teterboro, New Jersey

Chapter 22 Evaluation of methods

Jack Gauldie, Ph.D.

Associate Professor,
Department of Pathology,
McMaster University,
Hamilton, Ontario, Canada

Chapter 4 Spectral techniques

Lewis Glasser, M.D.

Chief, Hematopathology Laboratories,
Department of Pathology,
Arizona Health Sciences Center,
University of Arizona,
Tucson, Arizona

Chapter 41 Extravascular biological fluids

R. Jeffrey Goldsmith, Ph.D.

Associate Professor,
Department of Psychiatry,
University of Cincinnati Medical Center,
Cincinnati, Ohio

Chapter 52 Addiction and substance abuse

F. Michael Hassan, M.T.(ASCP)

Assistant Director of Toxicology,
Department of Pathology and Laboratory Medicine,
University of Cincinnati Medical Center,
Cincinnati, Ohio

Methods: Chapter 51

William R. Heineman, Ph.D.

Distinguished Research Professor,
Department of Chemistry,
University of Cincinnati,
Cincinnati, Ohio

Chapter 15 Electrochemistry: principles and measurements



Linda A. Heminger, B.S.(CNMT)

Department of Pathology and Laboratory Medicine,
University of Cincinnati Medical Center,
Cincinnati, Ohio

Methods: Chapters 27, 31

Peter Hickman, Ph.D.

Clinical Associate Professor of Pathology,
University of Queensland;
Director of Chemical Pathology,
Princess Alexandra Hospital,
Woolloongabba, Queensland, Australia

Methods: Chapters 27, 31

W. Edward Highsmith, Jr., Ph.D.

Director, Molecular Diagnostics Laboratory,
Department of Pathology,
School of Medicine,
University of Maryland at Baltimore,
Baltimore, Maryland

Chapter 48 Molecular biology in the clinical laboratory

Gregory A. Hobbs, Ph.D.

Department of Pathology,
University of Louisville School of Medicine,
Louisville, Kentucky

Methods: Chapter 49

David C. Hohnadel, Ph.D.

Director, Clinical Chemistry,
Department of Pathology,
The Genesee Hospital,
Rochester, New York

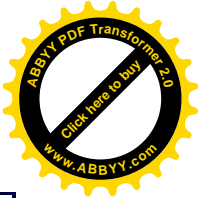
Chapter 54 Clinical enzymology

Oussama Itani, M.D.

Instructor in Pediatrics,
Department of Pediatrics,
University of Cincinnati,
Cincinnati, Ohio;
Director of Nurseries,
St. Luke's Hospital,
Ft. Thomas, Kentucky

Chapter 28 Bone disease

Gayle Jackson, M.S.



Supervisor, Clinical Laboratory,
Children's Hospital Medical Center,
Cincinnati, Ohio

Methods: Chapter 49

Ellis Jacobs, Ph.D.

Department of Pathology,
Director, Stat Laboratory,
Mt. Sinai School of Medicine,
Mt. Sinai Hospital,
New York, New York

Chapter 17 Point-of-care (near-patient) testing

Mark A. Jandreski, Ph.D.

Assistant Professor, Department of Pathology,
Loyola University of Chicago,
Director, Special Chemistry and Immunoserology,
Foster G. McGaw Hospital,
Loyola University Medical Center,
Maywood, Illinois

Chapter 19 Laboratory statistics

Sarah H. Jenkins, Ph.D.

Assistant Professor,
Director of Primary Services Laboratory,
Department of Pathology and Laboratory Medicine,
University of Cincinnati,
Cincinnati, Ohio

Chapter 15 Electrochemistry: principles and measurements

William R. Johnson, Ph.D.

Department of Pathology,
University of Louisville School of Medicine,
Louisville, Kentucky

Methods: Chapter 49

Saeed A. Jortani, Ph.D.

Department of Pathology,
University of Louisville,
School of Medicine,
Louisville, Kentucky

Methods: Chapter 56

Stephen E. Kahn, Ph.D.

Associate Professor, Pathology and Biochemistry,
Loyola University of Chicago;



Associate Director, Clinical Chemistry,
Foster G. McGaw Hospital,
Loyola University Medical Center,
Maywood, Illinois

Chapter 19 Laboratory statistics

Lawrence A. Kaplan, Ph.D.

Associate Professor,
Director, Clinical Chemistry and Toxicology Laboratories,
Bellevue Hospital;
Department of Pathology
New York University,
New York, New York

Chapter 14 Measurement of colligative properties

Chapter 23 Interferences in chemical analysis

Chapter 53 Classifications and description of proteins, lipids, and carbohydrates (Part I: Proteins; Part III: Carbohydrates)

Methods: Chapter 24

Steven C. Kazmierczak, Ph.D.

Associate Professor,
Scientific Director, Clinical Chemistry,
Department of Pathology and Laboratory Medicine,
East Carolina University School of Medicine,
Greenville, North Carolina

Methods: Chapters 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 32, 35, 36, 39, 47, 56

Thaddeus E. Kelly, M.D., Ph.D.

Professor, Department of Pediatrics,
University of Virginia Medical Center,
Charlottesville, Virginia

Chapter 47 Diseases of genetic origin

Jon R. Kirchhoff, Ph.D.

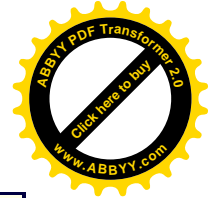
Associate Professor,
Department of Chemistry,
University of Toledo,
Toledo, Ohio

Chapter 15 Electrochemistry: principles and measurements

Leonard I. Kleinman, M.D.

Professor and Director of Newborn Services,
Department of Pediatrics,
State University of NY at Stony Brook School of Medicine,
Stony Brook, New York

Chapter 24 Physiology and pathophysiology of body water and electrolytes



Christian Kohler, M.D.

Department of Psychiatry,
Mental Health Clinical Research Center,
University of Pennsylvania,
Philadelphia, Pennsylvania
Chapter 42 Nervous system

William J. Korzum, Ph.D.

Department of Pathology,
Medical College of Virginia,
Richmond, Virginia
Methods: Chapters 24, 25

Robert W. Lang, M.T.(ASCP), M.B.A., C.L.S.(NCA)

Administrative Director of Laboratory Services,
LaGrange Memorial Hospital,
LaGrange, Illinois
Chapter 2 Laboratory management

Michael Lehrer, Ph.D.

Chief, Division of Biochemistry,
Department of Pathology,
Long Island Jewish Medical Center,
New Hyde Park, New York
Chapter 8 Mass spectrometry

Mark W. Linder, Ph.D.

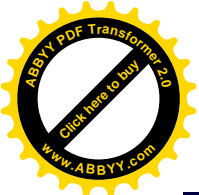
Department of Pathology,
University of Louisville,
School of Medicine,
Louisville, Kentucky
Methods: Chapter 42

John M. Lorenz, M.D.

Associate Professor of Pediatrics,
Director, Division of Neonatology,
Department of Pediatrics and Human Development,
Michigan State University;
Medical Director, Regional Newborn Intensive Care Services,
Sparrow Hospital,
Lansing, Michigan
Chapter 24 Physiology and pathophysiology of body water and electrolytes

John A. Lott, Ph.D.

Professor of Pathology,



The Ohio State University;
Director, Clinical Chemistry,
The Ohio State University Hospitals,
Columbus, Ohio

Chapter 29 The pancreas: function and chemical pathology
Methods: Chapters 27, 31, 49

Marvin H. Lucas, M.D.

Internal Medicine,
Premier Medical Associates,
Cincinnati, Ohio

Chapter 44 Thyroid

Michael D.D. McNeely, M.D.

Head, Chemistry and Immunology,
Metro-McNair Clinical Laboratories,
Victoria, British Columbia, Canada

Chapter 30 Gastrointestinal function and digestive disease

Craig E. Lunte, Ph.D.

Associate Professor,
Department of Chemistry,
University of Kansas,
Lawrence, Kansas

Chapter 15 Electrochemistry: principles and measurements

Charles L. Mendenhall, M.D.

Director of Hepatic Research,
Department of Digestive Diseases,
Veterans Affairs Medical Center,
Cincinnati, Ohio

Chapter 34 Alcoholism

M. Gregory Miller, Ph.D.

Associate Professor,
Department of Pathology,
Medical College of Virginia,
Richmond, Virginia

Methods: Chapters 24, 25

Patricia A. Miller-Canfield, M.D.

Staff Pathologist,
Department of Pathology,
Terra Haute Medical Labs,
Terra Haute, Indiana

Chapter 36 Hemoglobin



Herbert K. Naito, Ph.D.

Director, Clinical Chemistry,
Department of Laboratory Services,
Department of Veterans Affairs Medical Center,
Cleveland, Ohio

Chapter 33 Coronary artery disease and disorders of lipid metabolism

Chapter 53 Classifications and descriptions of proteins, lipids, and carbohydrates (Part II: Lipids)

Karen L. Nickel, Ph.D.

Chief, Laboratory Field Services,
California State Department of Health Services,
Berkeley, California

Chapter 45 Gonads

Steven A. Noel, Ph.D.

Department of Pathology,
Greater Baltimore Medical Center,
Baltimore, Maryland

Methods: Chapter 49

Ross L.G. Norris

Chief Scientist,
Department of Clinical Pharmacology,
Princess Alexandra Hospital,
Woolloongabba, Queensland, Australia

Methods: Chapter 51

Michael Oellerich, Ph.D.

Professor,
Georg-August-Universitat Gottingen,
Gottingen, Federal Republic of Germany

Chapter 56 Therapeutic drug monitoring (TDM): Practical aspects of TDM

Kalpana Panigrahi, Ph.D.

Fellow, Clinical Chemistry,
Department of Pathology,
University of Maryland,
Baltimore, Maryland

Chapter 55 Isoenzymes and isoforms

K. Michael Parker, Ph.D.

Professor, Department of Pathology,
Oklahoma Medical Center
Oklahoma City, Oklahoma

Methods: Chapter 34



Richard B. Passey, Ph.D.

Professor of Pathology,
Director, Clinical Chemistry Laboratory,
University of Oklahoma;
Director, Clinical Chemistry,
University Hospital,
Oklahoma City, Oklahoma

Chapter 21 Quality control for the clinical chemistry laboratory

Monika Payne, M.T.

Technologist,
Midwestern Regional Medical Center,
Zion, Illinois
Formerly in Department of Chemical Pharmacology,
Princess Alexandra Hospital,
Woolloongabba, Queensland, Australia

Methods: Chapter 31

Gerardo Perrotta, M.T.(ASCP), S.H.,

Coordinator, Primary Service Laboratory,
Department of Pathology and Laboratory Medicine,
University of Cincinnati Hospital,
Cincinnati, Ohio

Methods: Chapters 35, 36

Amadeo J. Pesce, Ph.D.

Professor,
Department of Pathology and Laboratory Medicine,
University of Cincinnati Medical Center,
Cincinnati, Ohio

Chapter 4 Spectral techniques

Chapter 23 Interferences in chemical analysis

Chapter 51 Toxicology

Methods: Chapter 31

Michael A. Pesce, Ph.D.

Professor,
Director of Laboratories,
Department of Pathology,
Columbia Presbyterian Medical Center,
New York, New York

Chapter 16 Automation

Alphonse Poklis, Ph.D.

Associate Professor, Department of Pathology,



Affiliate Professor, Department of Pharmacology and Toxicology,
Medical College of Virginia;
Director, Toxicology Laboratory,
Medical College of Virginia Hospitals,
Richmond, Virginia
Chapter 7 Gas chromatography
Chapter 51 Toxicology

Julia M. Potter, Ph.D.
Department of Chemical Pathology,
Royal Brisbane Hospital,
Herston, Queensland, Australia
Methods: Chapters 51, 56

Michael D. Privitera, M.D.
Associate Professor, Department of Neurology,
University of Cincinnati Medical Center;
Staff Neurologist,
Director, Epilepsy Treatment Center,
University of Cincinnati Hospital,
Cincinnati, Ohio
Chapter 42 Nervous system

Morris R. Pudek, Ph.D.
Clinical Professor, Department of Pathology,
University of British Columbia;
Clinical Chemist,
Vancouver General Hospital,
Vancouver, British Columbia, Canada
Chapter 46 Adrenal hormones and hypertension

Wolfgang A. Ritschel, M.D., Ph.D.
Professor of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics;
Head, Division of Pharmaceutics and Drug Delivery Systems,
University of Cincinnati Medical Center,
Cincinnati, Ohio
Chapter 56 Therapeutic drug monitoring (TDM): Basic overview of principles

Andrea Rose, Ph.D.
Department of Pathology,
University of Louisville School of Medicine,
Louisville, Kentucky
Methods: Chapter 32

Stephen J. Rossi, Pharm.D.
Division of Nephrology,



University of Michigan Medical Center,
Ann Arbor, Michigan

Chapter 50 Laboratory evaluation of the transplant recipient and donor

Donald L. Rucknagel, Ph.D.

Director, Sickie Center,
Children's Hospital Medical Center,
Cincinnati, Ohio

Chapter 47 Diseases of genetic origin

Paul Salm

Department of Clinical Pharmacology,
Princess Alexandra Hospital,
Woolloongabba, Queensland, Australia

Methods: Chapter 56

Edward A. Sasse, Ph.D.

Associate Professor, Department of Pathology,
Medical College of Wisconsin;
Chief, Chemistry Section, Pathology and Laboratory Medicine Service,
Milwaukee Veterans Affairs Medical Center,
Milwaukee, Wisconsin

Chapter 20 Reference intervals and clinical decision limits

Kevin T. Schleuter, Ph.D.

Department of Pathology and Laboratory Medicine,
University of Cincinnati,
Cincinnati, Ohio

Chapter 50 Laboratory evaluation of the transplant recipient and donor

William E. Schreiber, M.D.

Associate Professor, Department of Pathology and Laboratory Medicine,
University of British Columbia,
Vancouver, British Columbia, Canada

Chapter 35 Iron, porphyrin, and bilirubin metabolism

Timothy J. Schroeder, M.S.

Associate Professor,
Director, Transplant Division,
Department of Pathology and Laboratory Medicine,
University of Cincinnati Medical Center,
Cincinnati, Ohio

Chapter 50 Laboratory evaluation of the transplant recipient and donor

Arnold L. Schultz, Ph.D.

Associate Professor,



Department of Pathology,
University of Colorado Health Sciences Center,
Denver, Colorado
Methods: Chapter 26

Harold R. Schumacher, M.D.

Professor,
Director, Hematology Division,
Department of Pathology and Laboratory Medicine,
University of Cincinnati Medical Center,
Cincinnati, Ohio
Chapter 36 Hemoglobin

G. Berry Schumann, M.D.

Dianon Systems,
Stratford, Connecticut
Chapter 57 Examination of urine

Susan C. Schweitzer, M.S., M.T.(ASCP)

Department of Pathology,
University of Colorado Health Science Center,
Denver, Colorado
Chapter 57 Examination of urine

Bette Seamonds, Ph.D.

Assistant Professor, Department of Laboratory Sciences,
Thomas Jefferson University,
Philadelphia, Pennsylvania
Chapter 1 Basic laboratory principles and techniques (Part I: Basic laboratory principles)

Lester Shaw, Ph.D.

Professor,
Department of Pathology and Laboratory Medicine,
University of Pennsylvania;
William Pepper Laboratory,
Hospital of the University of Pennsylvania,
Philadelphia, Pennsylvania
Methods: Chapter 56

John E. Sherwin, Ph.D.

Consultant,
Westlake Village, California
Chapter 25 Acid-base control and acid-base disorders
Chapter 27 Liver function
Methods: Chapter 31



Lawrence M. Silverman, Ph.D.

Professor,
Director, Special Chemistry,
Department of Pathology,
North Carolina Memorial Hospital,
Chapel Hill, North Carolina

Chapter 31 Cardiac and muscle disease

Chapter 48 Molecular biology in the clinical laboratory

Chapter 55 Isoenzymes and isoforms

David A. Smith, M.S., Captain

Laboratory Science Officer,
United States Army Medical Service Corps,
Fort Sam Houston, San Antonio, Texas

Methods: Chapter 49

Juan R. Sobenes, M.D.

Associate Clinical Professor,
Department of Laboratory Medicine and Pathology,
Valley Medical Center, Fresno,
University of California,
Fresno, California

Chapter 27 Liver function

Bernard E. Statland, M.D.

National Reference Laboratories,
Nashville, Tennessee

Chapter 49 Neoplasia

Paul W. Stiffler, Ph.D.

Microbiology Consultant,
LaGrange Memorial Hospital,
LaGrange, Illinois

Chapter 2 Laboratory management

Jay Stoerker, Ph.D.

Applied Technology Genetics Corporation,
Malvern, Pennsylvania

Chapter 48 Molecular biology in the clinical laboratory

M. Wilson Tabor, Ph.D.

Associate Professor of Environmental Health,
Director of Environmental Analytical Chemistry,
Institute of Environmental Health,
University of Cincinnati Medical Center,
Cincinnati, Ohio



Chapter 5 Chromatography: theory and practice

Methods: Chapter 51

Paul J. Taylor

Department of Clinical Pharmacology,
Princess Alexandra Hospital,
Woolloongabba, Queensland, Australia

Methods: Chapter 56

Stephan G. Thompson, Ph.D.

Staff Scientist,
Coulter Corporation,
Hialeah, Florida

Chapter 13 Principles for competitive-binding assays

Reginald C. Tsang, M.D.

Gamble Professor of Neonatology, Obstetrics, and Gynecology,
University of Cincinnati Medical Center;
Director of Neonatology,
Associate Chairman of Pediatrics,
Children's Hospital Medical Center,
Cincinnati, Ohio

Chapter 28 Bone disease

Gregory J. Tsongalis, Ph.D.

Department of Pathology and Laboratory Medicine,
Hartford Hospital,
Hartford, Connecticut

Chapter 40 Pregnancy and fetal development

Kory M. Ward, Ph.D.

Associate Professor, Division of Medical Technology,
School of Allied Medical Professions,
Ohio State University,
Columbus, Ohio

Methods: Chapters 31, 54, 55

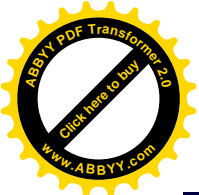
Robert E. Weesner, M.D.

Assistant Professor, Department of Internal Medicine,
University of Cincinnati Medical Center;
Director, GI Endoscopy Services,
Veterans Affairs Medical Center, Cincinnati, Ohio

Chapter 34 Alcoholism

John F. Wheeler, Ph.D.

Assistant Professor,



Department of Chemistry,
Furman University,
Greenville, South Carolina

Chapter 15 Electrochemistry: principles and measurements

Per Winkel, M.D., Doc. Med. Sci.

Clinical Chemistry Department,
Rigshospitalet,
Copenhagen, Denmark

Chapter 49 Neoplasia

Delores Wishart, M.T.(ASCP)

Laboratory Administrative Director,
Alexian Brothers Medical Center,
Elk Grove Village, Illinois

Chapter 2 Laboratory management

Steven H.Y. Wong, Ph.D.

Professor, Pathology and Psychiatry & Behavioral Medicine,
Director, Clinical Toxicology and Therapeutic Drug Monitoring,
Department of Pathology,
Medical College of Wisconsin,
Milwaukee, Wisconsin

Chapter 51 Toxicology

To our wives

Judith E. Kaplan and Anna Pesce

whose love and support have not diminished in these years

and our mentors

Samuel Natelson and George F. Grannis

whose imparted knowledge continues to serve us and future generations.

Preface

It has been more than a decade since the first edition of the textbook was published. In



the ensuing time we have been very gratified by the response from our readership. We have changed the text of this edition of *Clinical Chemistry* in response to both the constructive criticisms that we have received and the continued evolution of the field. Recent changes in clinical chemistry reflect both the economic pressures for continuing the historic trends for increased automation and laboratory consolidation, and the strong effect of regulatory forces, which requires clinical chemists to have expertise as managers.

Therefore we have added a new chapter on *Laboratory Management* (Chapter 2) and upgraded all the text to reflect CLIA'88 regulations. The management chapter can be used by all readers, at all levels, to better cope with the increasing regulatory nature of the profession. The new chapter on *Mass Spectrometry* (Chapter 8) reflects the more widespread use of this technique. The new chapters reviewing *Laboratory Evaluation of the Transplant Recipient and Donor* (Chapter 50) and *Addiction and Substance Abuse* (Chapter 52) will help readers understand the changes and growth of these clinical disciplines. Readers will find that almost all the chapters have been revised to incorporate the latest clinical and technical advances.

We would like to point out the chapters on *Liquid Chromatography* (Chapter 6), *Immunochemical Techniques* (Chapter 12), and *Automation* (Chapter 16), which have been extensively revised to incorporate the many technical changes that have occurred in these areas since the second edition. Laboratory Statistics, has been rewritten to provide students with practical examples of statistics as applied in the clinical laboratory. Chapter 20, *Reference Intervals and Clinical Decision Limits*, has been revised to incorporate NCCLS guidelines.

In a major change from the previous edition, we have deleted the separate "methods" section and placed the description of individual methods in the clinical chapters where the use of these analytes are discussed. This change allowed more space to be allotted to updating the clinical and technical chapters and allowed us to add the new chapters noted above. To facilitate ready access by students to the method reviews, we have placed each review at the end of the appropriate clinical chapter in a new, discrete chapter section, *Methods of Analysis*.

We believe that educators will appreciate that this modification of *Clinical Chemistry*, responding to the continued change in laboratories toward the use of prepackaged reagents, will allow them to focus on what is important for students entering the field of clinical chemistry.

We would like to recognize the important contribution of Dr. Steven C. Kazmierczak, who served as the editor of the methods areas of the text, to this edition. With his help, we have tried to choose methods for review that will be most useful for teaching the modern principles of analysis.

We continue the liberal use throughout the text of summary tables and boxes and figures in the belief that these are useful aids to the learning process. The chapter outlines and glossary of key terms, to which our educator colleagues have responded so favorably, are continued and expanded to all new chapters.

The result of these changes is, on one hand, a textbook that will be very familiar to those who have used the previous editions. This will allow educators to reuse current teaching plans. On the other hand, the changes ensure that students will be learning from a textbook that will reflect the most recent changes in the field. We believe, therefore, that more than ever, this text can continue to take its place as both a teaching text for students in



medical technology and an up-to-date reference book for advanced students and for individuals already practicing clinical chemistry.

We would like to thank the directors of our academic departments of pathology (Drs. Vittorio Defendi and John Pearson, New York University, and Dr. Fenoglio-Priser, University of Cincinnati) for providing an atmosphere in which this work could be completed. We cannot give enough thanks to our many authors who have provided the reader with their expertise. We thank Judith E. Kaplan, for once again ensuring that the text would be most readable, and to our editor, Mr. James F. Shanahan for his forbearance over the past years. We acknowledge Dr. Myer Horowitz for his help in reviewing manuscripts and the expert word processing of Georgia Coddington and Diane Gorman.

SECCIÓN 1

CAPÍTULO 1

1. Principios y Técnicas Básicas del Laboratorio

Bette Seamonds

Elizabeth Ann Byrne

Parte I: Principios y técnicas básicas del laboratorio

Agua como reactivo

Agua con grado de reactivo

Proceso de purificación

Grados de pureza del agua

Almacenamiento y manejo del agua como reactivo

Sugerencias de uso

Control de calidad y pruebas de impureza

Sistema de documentación y almacenamiento de registros

Materiales de laboratorio químico

Sustancias químicas

Estándares primarios

Materiales para estándares de referencia

Solventes orgánicos

Gases

Seguridad en el manejo de sustancias químicas

Desecantes



Limpieza y composición del material de vidrio y plástico laboratorio

Utensilios de laboratorio

- Pipetas**
- Micropipetas**
- Diluidores y dispensadores**

Técnicas volumétricas

- Pipetas de clase A**
- Micropipetas**
- Procedimientos generales para la preparación de soluciones**
- Control de calidad de micropipetas, dispensadores y diluidores**

Unidades de medidas

- Unidades SI**
- Unidades SI en el laboratorio clínico**

Medición de masas

- Tipos de balanzas**
- Requisitos para la operación**
- Procedimientos de mantenimiento**

Termometría

- Tipos de termómetros**
- Calibración de termómetros de líquido en vidrio**

Baños de agua, placas térmicas y hornos

Centrífugas

- Tipos**
- Componentes de una centrífuga**
- Mantenimiento y aseguramiento de la calidad del trabajo del laboratorio en general**
- Principios de centrifugación**

Seguridad en el laboratorio

- Prácticas generales de seguridad**
- Plan de higiene de sustancias químicas**
- Procedimientos estándares de operación**
- Inventario**
- Almacenamiento de sustancias químicas**
- Requisitos de etiquetado y manejo**
- Control de sustancias químicas y desechos**
- Protección contra desechos de contaminantes biológicos**

Parte II: Cálculos en química clínica



Dilución

Otras aplicaciones de las diluciones

Ejercicios

Pesos y concentraciones

Definiciones y ejemplos

Ejercicios

Ejemplos de cálculos

Cálculos basados en mediciones fotométricas (Ley de Beer)

Colorimetría

Absorbancia y transmitancia

Coefficiente de extinción molar

Ejercicios

Amortiguadores

Cálculos enzimáticos

Curvas estándar

Gráficas

Cálculos para pruebas de depuración renal

Pruebas urinarias usando el factor tiempo

Ejercicios adicionales

Apéndice: Solución de los problemas

OBJETIVOS

- ♦ Describir los métodos usados para la purificación del agua, las especificaciones, usos, almacenamiento y manejo de procedimientos asociados con los diferentes grados del agua como reactivo.
- ♦ Describir los procedimientos para el análisis de impurezas y control de calidad usados para los diferentes grados del agua como reactivo.
- ♦ Enlistar los suministros comúnmente usados en el laboratorio y describir los procedimientos para su uso apropiado, control de calidad, limpieza, y mantenimiento.
- ♦ Comparar y contrastar el uso y cuidado del material de vidrio y plástico.
- ♦ Describir las especificaciones asociadas con la calidad de las sustancias químicas y solventes.
- ♦ Conocer los procedimientos apropiados para el uso de pipetas.
- ♦ Describir la operación y mantenimiento de balanzas, centrífugas, baños de agua, y placas térmicas en el laboratorio clínico.
- ♦ Describir el uso y calibración de termómetros.
- ♦ Conocer las regulaciones generales de seguridad del laboratorio, los componentes obligatorios de OSHA del Plan de Higiene de Sustancias Químicas, y el plan de protección contra microorganismos patógenos.

Términos clave



balanzas Instrumentos mecánicos o electrónicos usados para obtener medidas exactas de peso.

baño de agua Un aparato con temperatura controlada llenado con agua, usado para calentar y mantener materiales a una temperatura específica.

bureta Utensilio del laboratorio utilizado para dispensar un extenso rango de volúmenes en forma exacta.

cilindro graduado Utensilio de laboratorio utilizado para medir líquidos.

deseccante Material utilizado en el desecador para absorber la humedad del ambiente.

desecador Recipiente grande utilizado para almacenar material en un ambiente libre de agua.

dilución Proceso para preparar soluciones de menor concentración a partir de una solución de mayor concentración.

embudo Utensilio de laboratorio usado para transferir líquidos o sólidos a otro recipiente.

jeringa Un artículo usado para extraer una cantidad específica de líquido y después vaciarlo volumétricamente.

matraz Erlenmeyer Utensilio de laboratorio empleado para contener líquidos.

matraz volumétrico Material de laboratorio usado para contener un volumen específico de líquido.

microorganismos patógenos Agentes potencialmente infecciosos en la sangre y fluidos corporales.

OSHA La Administración de la Salud y Seguridad Ocupacional ("Occupational Safety and Health Administration"). Agencia del gobierno estadounidense responsable de emitir las regulaciones para promover la seguridad de los lugares de trabajo.

pipeta Utensilio de laboratorio usado para transferir un volumen específico de líquido.

placa térmica Un aparato con temperatura controlada para mantener materiales a una temperatura determinada.

Plan de Higiene de Sustancias Químicas Regulaciones ordenadas por la OSHA para proteger a los empleados de riesgos contra sustancias químicas peligrosas.

pureza de agua Se definen tres niveles de pureza, los cuales se basan en la cantidad de material biológico, orgánico e inorgánico disuelto presente en el agua.

pureza química El grado de pureza o homogeneidad de una sustancia es designado por varias agencias científicas como la Sociedad Americana de Química ("American Chemical Society") y el Instituto de Estándares y Tecnología ("National Institute of Standards and Technology").

purificación del agua Un proceso de tratamiento (destilación, desionización, ósmosis inversa, tratamiento UV, ultrafiltración, u ozonólisis) usado para eliminar contaminantes del agua.

sanidad El proceso usado para mantener la limpieza del sistema de purificación del agua.

Sistema Internacional de Unidades ("Système International d'Unités") Sistema de medidas internacionalmente aceptado.

sistema métrico Sistema usado para medir pesos, distancias y volumen.

termómetro Un aparato físico, electrónico, u óptico que se usa para medir la temperatura.

vaso de precipitado Utensilio del laboratorio usado para contener líquidos o sólidos.



Parte 1: Principios y técnicas básicas del laboratorio

BETTE SEAMONDS

Para proveer datos clínicos exactos y precisos, el laboratorio de química clínica debe interesarse en los componentes y métodos analíticos utilizados para obtener tales datos. La familiaridad con la pureza de las sustancias químicas, solventes, y agua con grado de reactivo es esencial. Además, la selección y el uso del equipo analítico apropiado, y las prácticas de seguridad en el trabajo, son de gran importancia.

El Agua Como Reactivo

El agua es uno de los reactivos más importantes y comúnmente usados en el laboratorio clínico. Debido a su importancia como reactivo en el laboratorio y, porque frecuentemente se "produce" dentro de cada laboratorio, el agua es discutida más ampliamente en la siguiente sección.

Agua con grado de reactivo

Las impurezas, tanto orgánicas como inorgánicas, en el agua usada como reactivo puede producir errores significativos en un análisis. Algunas impurezas son fáciles de identificar, pero otras son mucho más difíciles. La necesidad del agua como reactivo altamente puro en el laboratorio clínico debe ser sumamente enfatizada.

Los sistemas de agua diseñados en forma inapropiada o con mantenimiento inadecuado pueden añadir contaminantes que originalmente no existían en el agua que alimenta el sistema. De este modo la calidad del agua como reactivo producida por diferentes sistemas de purificación puede presentar marcadas diferencias. En general, los sistemas que continuamente recirculan el agua proveen protección contra su estancamiento y, consecuentemente, minimizan el crecimiento bacteriano. Sin embargo, siempre es necesario descontaminar el sistema a intervalos regulares. El material de las tuberías es importante; plásticos tales como cloruro polivinílico (más conocido por su abreviatura inglesa como "PVC") se usan comúnmente pero no son necesariamente la mejor opción. El PVC, en particular, deja escapar impurezas orgánicas en el agua purificada. Además tiene una superficie porosa, la cual tiende a albergar bacterias y otras impurezas orgánicas. Para información más detallada refiérase a la guía: *Preparación y Pruebas de agua como reactivo para Laboratorio*, publicado por el Comité Nacional de Estándares para el Laboratorio Clínico ("National Committee for Clinical Laboratory Standards" o "NCCLS", en inglés). [ref\(1\)](#)

La calidad del agua no es sinónimo del proceso de purificación usado. Pueden emplearse diferentes tipos de procesos de purificación y en varios laboratorios a menudo se usan procesos múltiples. La calidad de la fuente de obtención del agua (alimentación de agua) es de gran importancia, ya que frecuentemente con base en ellos se determina que procesos de purificación deberán usarse y finalmente que tipo de contaminantes posiblemente permanecerán. Varias de las características de fuentes de obtención del agua serán afectadas por variaciones geográficas o de la estación. La variabilidad debida a la estación depende de parámetros tales como lluvias, drenajes, depuración de aguas residuales y desechos



industriales, mientras que la localización geográfica determinará la dureza (contenido mineral) del agua suministrada. La Tabla 1-1 resume la efectividad de siete procesos de purificación para remover contaminantes del agua suministrada. El laboratorio deberá trabajar muy de cerca con un buen fabricante de sistemas de purificación de agua para diseñar un sistema que cumpla con las necesidades específicas del laboratorio.

Proceso de purificación

Destilación.

La destilación del agua en vidrio elimina efectivamente bacterias, pirógenos, material particulado, sólidos ionizados disueltos, y en menor proporción, contaminantes orgánicos disueltos. No es útil para la eliminación de gases ionizados disueltos tales como amoníaco, dióxido de carbono y cloro o compuestos orgánicos con bajo punto de ebullición.

Desionización.

En el proceso de desionización, el agua es pasada a través de una capa de resinas de intercambio iónico. Los iones hidrógeno e hidroxilo en la superficie de la resina son desplazados por impurezas catiónicas y aniónicas. Este proceso es excelente para remover sólidos y gases ionizados disueltos pero es ineficaz para todos los demás contaminantes. Además, la capacidad de unión de la resina se agota rápidamente, siendo necesario regenerarla o reemplazarla frecuentemente. La desionización se usa en conjunto con la *absorción de carbono*, proceso que es muy efectivo para remover compuestos orgánicos disueltos. Las características del carbono empleado determinan la eficacia para remover diferentes contaminantes orgánicos. Ni la desionización ni la absorción por carbono removerán el material particulado, bacterias o pirógenos.

Ósmosis inversa.

En la ósmosis inversa, el agua se pasa a presión a través de una membrana semipermeable dejando detrás residuos orgánicos disueltos iónicos e impurezas suspendidas, incluyendo contaminantes microbianos y virales. La ósmosis inversa, sin embargo, no remueve gases disueltos en forma efectiva. Este método se usa frecuentemente para pretratar agua antes de purificarla por desionización.

Ultrafiltración.

En la ultrafiltración, el agua es pasada a través de una membrana semipermeable con un tamaño de poro ≤ 0.22 μm , removiendo el material particulado, sólidos emulsificados, la mayoría de bacterias, y pirógenos. El uso de membranas postfiltro de 0.1 μm está siendo incrementado para obtener un mejor producto, libre de bacterias y pirógenos. La ultrafiltración no es efectiva para remover sólidos ionizados disueltos, gases, y la mayoría de los contaminantes orgánicos.

Oxidación UV y esterilización.

La oxidación con luz UV y la esterilización, son usados después de otros procesos de purificación para remover trazas de contaminantes orgánicos (oxidación) y bacterias (esterilización). Para estos procesos se usan diferentes longitudes de onda; 185 nm para



oxidación y 254 nm para esterilización. El tratamiento por UV es limitado por la intensidad, el tiempo de contacto, y la velocidad de flujo.

Ozono.

El tratamiento con ozono, se usa principalmente en escenarios industriales, remueve eficazmente los contaminantes orgánicos. Sin embargo, los generadores de ozono más pequeños y menos caros están siendo accesibles e indudablemente encontrarán su camino dentro del ambiente de los laboratorios clínicos. Una vez introducido al agua pretratada, el ozono mata las bacterias rompiendo la membrana celular casi instantáneamente (~2 seg). El cloro, por otro lado, simplemente se difunde dentro de la célula y requiere aproximadamente una media hora para alcanzar su efecto. La velocidad real de lisis es dependiente del nivel de ozono: se usan concentraciones altas de ozono para sistemas altamente contaminados, mientras que las concentraciones bajas se usan para mantenimiento. Después de que los microorganismos son lisados, los constituyentes citoplásmicos son oxidados por el ozono. Entonces el ozono es separado por irradiación UV a 254 nm. Separarlo es crítico ya que el ozono es incompatible con las resinas de desionización.

El tratamiento con ozono resulta eficaz para combatir la contaminación microbiana en tuberías y en el agua purificada.

Grados de pureza del agua

El NCCLS ha definido tres niveles de pureza del agua (tipos I, II, y III) más una categoría especial de agua como un reactivo. El Colegio de Patólogos Americanos ("The College of American Pathologists", o "CAP", en inglés) también ha definido tres grados de agua como reactivo, los cuales son esencialmente equivalentes a los del NCCLS. La Tabla 1-2 resume las especificaciones del NCCLS para estos tres niveles de agua. Los tipos de agua que estén dentro de la categoría "especial" requieren tratamiento adicional para cumplir con los requisitos y aplicaciones específicos.

El agua que cumple con las especificaciones publicadas por otras agencias tales como La Sociedad Americana de Pruebas y Materiales ("American Society for Testing and Materials" o "ASTM", en inglés), la Sociedad Americana de Química ("American Chemical Society" o "ACS", en inglés), y la Farmacopea de Estados Unidos ("United States Pharmacopeia" o "USP", en inglés) pueden o no ser equivalente al agua que cumple las especificaciones del NCCLS. El agua definida por la ASTM es muy similar al agua de tipo II de la NCCLS, mientras que las especificaciones de la USP están diseñadas para garantizar la seguridad de su aplicación in vivo e in vitro. El agua USP debe pasar una serie de pruebas designadas para documentar la ausencia de pirógenos, más que para cumplir con los requisitos de máxima concentración de contaminantes.

Almacenamiento y manejo del agua como reactivo

El agua de tipo I debe ser usada inmediatamente después de ser producida. No puede ser almacenada porque su resistividad disminuye rápidamente a medida que el dióxido de carbono es absorbido. Además los contaminantes iónicos y orgánicos se extraen del recipiente de almacenamiento y puede ocurrir contaminación microbiana.^{ref(2)} El agua de tipo II puede



ser almacenada por períodos cortos. Los sistemas de almacenamiento y distribución deben ser contruidos con un material que minimice la contaminación química y bacteriana. Cuando el agua es transferida del tanque de almacenamiento a un recipiente secundario de uso rutinario, tanto el agua como el recipiente deben ser reemplazados diariamente. El agua para uso diario no debe ser almacenada en garrafones ya que esto conduce a la degradación de la calidad del agua.^{ref(3)}

Bajo ciertas condiciones se puede usar el agua comercial que ofrecen los fabricantes. Un ejemplo de esa agua es la que se provee como diluyente por los fabricantes para un sistema analítico específico. En este caso el agua ha sido validada por el fabricante para su uso indicado en el instructivo del producto. Bajo ninguna condición puede sustituirse ese producto por agua como reactivo. Similarmente, el agua esterilizada no es equivalente al agua con grado de reactivo, por lo tanto no hay un sustituto aceptable. Como ya se dijo, el agua USP cumple las especificaciones para pruebas particulares y no para contaminantes específicos. Otros productos que se compran incluyen aquellos para el uso en cromatografía de fase líquida de alta eficacia (“High Performance Liquid Chromatography” o “HPLC”, en inglés), para los cuales la calidad del agua producida en las instalaciones del laboratorio no es satisfactoria.

Sí el agua debe ser comprada, hay varios aspectos de importancia. El producto adquirido deberá definir su contenido de sílice, contaminación bacteriana, y conductividad al tiempo de su manufactura. El agua debe ser comprada en cantidades apropiadas para su uso. El agua envasada debe ser protegida de la contaminación ambiental y de los efectos de escape de contaminantes del recipiente. Cuando el recipiente es abierto, debe medirse la cuenta bacteriana y la conductividad para determinar la degradación de la calidad a partir de su manufactura. Los límites de aceptabilidad deben ser similares a los del agua tipo II. Cuando se requiera analíticamente, el agua debe ser transferida a un recipiente secundario del cual podrán tomarse muestras. Debe tenerse cuidado de no tocar la parte interna de la tapa o introducir mangueras o pipetas directamente en el recipiente primario. Los volúmenes de agua que no se usen no deben regresarse al recipiente primario. El agua del recipiente primario debe ser descartada después de un período no mayor de una semana.

La compra de agua provee una fuente ideal de suministro para sistemas sencillos de purificación. Muchos de estos sistemas están ahora disponibles permitiendo incluso a laboratorios más pequeños producir cantidades limitadas de agua tipo I.

Sugerencias de uso

La Tabla 1-3 resume algunas sugerencias para el uso de los tres grados de agua. Hay poca literatura documentando las dificultades analíticas causadas por una deficiente calidad del agua. Sin embargo, muchos usuarios del documento del NCCLS sobre el agua como reactivo, han reportado ejemplos específicos de problemas analíticos atribuidos a la calidad del agua. Estos incluyen: dificultad con los ensayos hormonales espectrofotométricos, dificultad con los análisis de hematología y coagulación, interferencia con algunos procedimientos de inmunoanálisis, problemas de instrumentación incluyendo dificultades en las absorbancias de fondo, escape de contaminantes procedentes de la regeneración inapropiada de las resinas de desionización, y absorción de perfume en una agua altamente purificada, causando dificultades con los cultivos celulares. Además, ha sido demostrada la interferencia de bacterias, silicatos y otros iones contaminantes en los análisis de enzimas y bilirrubinas.^{ref(4)} Indudablemente, a



medida que las técnicas se vuelvan más sensibles, se dispondrá de información más definitiva .

El agua tipo I debe usarse en todos los procedimientos cuantitativos y la mayoría de los procedimientos cualitativos del laboratorio, para análisis electroforético, para procedimientos de tamizaje en toxicología y en la preparación de amortiguadores, estándares, y controles. Un tratamiento posterior del agua tipo I puede ser necesario para análisis de elementos traza y metales pesados. El agua tipo II es aceptable para uso en reactivos con preservativos o para reactivos que están esterilizados, y para la mayoría de tinciones. El agua tipo III es aceptable para el lavado y enjuague preliminar de cristalería. También puede servir como fuente de agua para purificación posterior.

El uso del agua como reactivo puede ser necesario para un propósito especial, como en los procedimientos específicos de HPLC, análisis cromosomal, pruebas del Sistema Antigénico Linfocítico Humano (Human Lymphocyte Antigen” o “HLA”, en inglés), y fertilización in vitro, así como en el procedimiento de Trasferencia Intrafalopiana del Gameto (IVF/GIFT) (In Vitro Fertilization” o “IVF” y “Gamete Intrafallopian Transfer”, en inglés). Pueden diseñarse sistemas para producir agua que cumpla requerimientos específicos o se puede purificar posteriormente el agua tipo I.

Control de calidad y pruebas de impurezas

El agua debe ser revisada a intervalos regulares para evaluar la eficiencia del sistema de purificación de agua. Debido a la variedad de los contaminantes encontrados en el agua, no es suficiente una sola prueba para medir su pureza. El tiempo programado para las evaluaciones regulares puede variar con la estación y los contaminantes encontrados. Además de asegurar que el sistema de purificación está funcionando aceptablemente bajo condiciones normales, el monitoreo asegura la pureza del agua después de que uno o más componentes han sido reemplazados. Como mínimo, son necesarias las determinaciones de sobrevivencia bacteriana y resistividad. El control de otros parámetros tales como, pH, contenido de silicatos, pirógenos, contaminación orgánica, y material particulado, dependen de varios factores. Cada laboratorio tendrá que determinar la frecuencia de las revisiones basado en la historia, diseño y uso del sistema. En general, si la fuente de obtención de agua y el sistema de purificación generan un producto consistentemente negativo para un contaminante particular, el laboratorio puede analizar ese contaminante con menor frecuencia. Algunos de estos análisis pueden realizarse en el laboratorio mientras que otras pueden ser referidas a otro laboratorio.

Control del contenido microbiano.

Las bacterias pueden inactivar reactivos al metabolizar ciertos componentes del reactivo. Además, ellas contribuyen al total de la contaminación orgánica y pueden alterar las propiedades ópticas de las soluciones en los análisis. Aunque el control microbiano es retrospectivo, éste provee al laboratorio de información útil y puede ayudar a identificar problemas inminentes. Las pruebas deben hacerse semanalmente. Hay varios métodos aceptables que están disponibles, aunque no hay un solo método que pueda cuantificar todas la bacterias en una muestra de agua. De esta manera el número de bacterias viables puede ser más alto que el número de unidades formadoras de colonias, determinado por cualquier método. Para determinar el método adecuado se pueden aplicar varios criterios, pero independientemente del método seleccionado, la primera etapa para la obtención de un

resultado confiable es la colecta de una muestra apropiada.

Antes de la colecta, se debe abrir totalmente el grifo por lo menos un minuto. Este procedimiento limpiará el sistema adecuadamente. El sistema también debe ser lavado antes de extraer agua que será usada en la preparación de reactivos. Una de las causas más comunes de contaminación bacteriana en el agua es el lavado inadecuado. El volumen de agua colectada para análisis variará con el procedimiento usado. Pueden ser colectados desde 1 mL (para muestreador bacteriológico) hasta 100 mL (para una cuenta estándar de placa o métodos de filtración). Después de la colecta, la muestra debe ser procesada tan pronto como sea posible. La muestra no debe ser almacenada por más de una hora a temperatura ambiente ó 6 horas en refrigeración. Para ciertos procedimientos la muestra se debe mezclar vigorosamente para asegurar la distribución de los organismos dentro de la muestra. Los organismos más comúnmente encontrados son los gram negativos.

Resistividad.

Las mediciones de resistividad se usan para valorar el contenido iónico del agua purificada. Entre más alto sea el contenido de iones, menor será la resistividad. Los tanques de intercambio iónico deben estar equipados con luces sensoras conectadas en línea al sistema que estén calibradas para apagarse cuando la resistividad esté por debajo de 2 MΩ-cm, valor en el cual la capacidad del tanque está agotada. Los sistemas que suplen agua tipo I deben tener un medidor de resistividad en línea que sea capaz de leer hasta 18 MΩ-cm. La resistividad debe ser al menos de 10 MΩ-cm (preferentemente entre 15 y 18 MΩ-cm) para cumplir con las especificaciones tipo I. Para controlar el agua de los tipos II y III, pueden usarse los medidores de resistividad que no están conectados en línea, sin embargo, las mediciones en línea son más fáciles, exactas, y son recomendadas para sistemas productores de tipo II. Existen procedimientos disponibles para mediciones que no están en línea.^{ref(5)} La frecuencia del control debe ser diaria.

pH.

Generalmente no es necesario controlar el pH del agua purificada (particularmente de tipo I). Hay métodos disponibles en caso de que se sospeche algún problema con el pH.^{ref(6)} Algunos reportes sugieren que en ciertas fuentes de obtención del agua, los problemas de pH han resultado en problemas de pH en el agua producida. Ahora existen algunos sistemas que permiten mediciones de pH en línea. Estos sistemas, sin embargo, todavía no son usados en los laboratorios clínicos.

Pirógenos.

Los pirógenos no son controlados rutinariamente en el laboratorio clínico. Sin embargo, hay reportes de fabricantes que indican que algunos reactivos de inmunoanálisis son afectados por la interferencia procedente de pirógenos. De esta manera las pruebas para estos contaminantes pueden volverse más importantes con el tiempo. Tales procedimientos ya están disponibles.^{refs(7)}

Sílice.

La presencia de sílice en el agua de suministro puede ser un gran problema en ciertas áreas geográficas. El sílice puede interferir los análisis de elementos traza y de electrolitos,



determinaciones de enzimas, y algunos ensayos espectrofotométricos. El sílice coloidal se remueve fácilmente por destilación y también con ciertas membranas de ósmosis inversa. El sílice soluble puede ser medido por análisis espectrofotométrico.^{ref(8)} Sin embargo, el procedimiento requiere del uso de instrumentos de una reducida amplitud de banda, preferentemente aquellos capaces de leer a ~800 nm. Frecuentemente los blancos de reactivo generan absorbancias más altas que el agua de prueba. Por esta razón puede ser preferible referir las muestras para análisis por espectrometría de inductividad acopladas a plasma (“Induced Coupled Plasma” o “ICP”, en inglés).

Contaminantes orgánicos.

Las bacterias se pueden multiplicar en las bases de las resinas, incrementando significativamente la contaminación orgánica del agua. Aunque existen muchos métodos para valorar contaminación en forma rutinaria, estos no son suficientemente específicos o no son prácticos (requieren HPLC y espectrofotómetros con la calidad requerida para el trabajo de investigación). Si el laboratorio cuenta con un equipo de HPLC, estas mediciones se pueden hacer fácilmente.^{ref(9)} La mejor forma de enfrentar el problema de contaminación es manteniendo el sistema en condiciones óptimas. La limpieza sanitaria debe llevarse a cabo por lo menos cada semestre (o más frecuentemente, si los datos del control de calidad así lo dictan) para ayudar a controlar los niveles de bacterias. El uso de absorción al carbón y el tratamiento con UV pueden ayudar a remover contaminantes orgánicos. La vigilancia constante del sistema asegurará la calidad deseada en la producción del agua como reactivo.

Sistema de documentación y mantenimiento de registros

Debe desarrollarse un manual de procedimientos para el sistema de purificación del agua que incluya: (1) plan de aseguramiento de la calidad definiendo responsabilidades del personal, (2) procedimientos para el mantenimiento preventivo, (3) listas de revisión del control de calidad, (4) hojas de trabajo de registro diario, semanal, mensual, y de otro tipo de pruebas, y (5) documentación de todas las acciones correctivas adoptadas.^{refs(10)}

Suministros químicos del laboratorio

Sustancias químicas

Las sustancias químicas están disponibles en una variedad de grados de pureza y a menudo los tipos y concentraciones de impurezas son conocidas. Los grados de menor pureza de sustancias químicas son: *químicamente puro (CP)*, *grado práctico*, *grado técnico* y *grado comercial*. El uso de tales sustancias químicas no es apropiado para el trabajo analítico. Ciertas sustancias químicas, especialmente farmacéuticas, son producidas para cumplir con las especificaciones de la Farmacopea de los Estados Unidos (*USP*), *El Formulario Nacional* (*"The National Formulary" o "NF"*, en inglés) y *El Código de Drogas en los Alimentos* (*"The Food Chemical Index" o "FCI"*, en inglés). Estas especificaciones definen las tolerancias de impurezas para prevenir daños a la salud.

La mayoría de análisis cualitativos y cuantitativos en el laboratorio clínico, requieren del uso de las sustancias químicas que cumplan con las especificaciones de la Sociedad



Americana de Química tales sustancias químicas son descritas ya sea como grado analítico o como grado reactivo. Las especificaciones de la ACS establecen las cantidades máximas de impurezas permitidas en cada sustancia o proveen el contenido de impurezas entre los lotes de sustancias químicas. Algunos fabricantes venden materiales certificados o muy puros cuando las especificaciones no han sido establecidas por la ACS.

La Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (the "*International Union for Pure and Applied Chemistry*" o "*IUPAC*", en inglés) ha especificado estándares adicionales de pureza para ciertas sustancias. Estos incluyen; estándares para pesos atómicos (grado A); estándares finales (grado B); estándares primarios (grado C), los cuales están disponibles comercialmente y tienen menos del 0.002% de impurezas; estándares de trabajo (grado D), los cuales están disponibles comercialmente tienen menos de 0.05% de impurezas y sustancias secundarias (grado E), las cuales están definidas o estandarizadas por un método de referencia aceptable usando un estándar primario (grado C) como material de referencia.

Estándares primarios

Son suministrados con certificados de análisis para cada lote. Estas preparaciones deben ser estables, sustancias no higroscópicas de composición definida que pueden ser secadas sin cambiar su composición.

Estándares de referencia

Los materiales estándares de referencia, MERs (Standard Reference Materials" o "SRMs", en inglés), están disponibles por el *Instituto Nacional de Estándares y Tecnología* ("*National Institute for Standards and Technology*" o "*NIST*", en inglés). No todos los MERs son tan puros como los estándares primarios, sin embargo, el NIST define sus propiedades físicas y químicas y provee un certificado documentando los resultados de caracterización. Estos estándares pueden entonces ser usados para caracterizar otros materiales. Los MERs están disponibles en forma sólida, líquida o gaseosa. Los sólidos pueden ser productos cristalinos, polvos o liofilizados.

Solventes orgánicos

La clasificación de los solventes orgánicos sigue las mismas especificaciones usadas para otras sustancias químicas. De esta forma, análisis tales como la espectroscopía y cromatografía, requieren el uso de reactivos de más alta pureza que el uso de grado reactivo. Estos reactivos generalmente son referidos como *espectrogrado*, *nanogrado* o *grado HPLC* y la información acerca de la presencia de contaminantes se suministra con el solvente. La pureza asegura mínima interferencia espectral y una contaminación residual mínima después de la extracción y evaporación del solvente en el procedimiento analítico. En general estos solventes tienen una pureza mayor del 99% (determinado por cromatografía de gases) y ninguna impureza excede del 0.2%.

Gases



Los gases, particularmente aquellos usados en análisis de cromatografía de gas y absorción atómica, deben ser extremadamente puros. La pureza del gas helio debe ser del 99.9999% para procedimientos de cromatografía de gases. Como sucede con otros reactivos, la información referente a sus contaminantes y sus concentraciones es de vital importancia. (Ver Apéndice D para información más específica.)

Seguridad en el manejo de sustancias químicas

Muchas sustancias químicas y solventes son inflamables, teratogénicos o carcinogénicos. Por lo tanto, toda sustancia química debe ser manejada con gran cuidado y debe evitarse la inhalación de vapores o polvos. Similarmente, el manejo de cilindros de gases requiere estricta adherencia a las regulaciones. Las prácticas específicas de seguridad serán discutidas en la sección de seguridad en el laboratorio.

Desecantes (Tabla 1-4)

Un desecante es un material usado para absorber y remover agua del aire o de otra sustancia. Algunos desecantes se hidratan y pierden su eficacia después de que ocurre su hidratación. Otros producen polvo y deben ser evitados. Los desecantes más comúnmente usados son fabricados con una sal indicadora sensible a la humedad, como cloruro de cobalto, para indicar su saturación. La gel de sílice y el Drierite (sulfato de calcio anhidro) son ejemplos de éstos. Estos agentes pueden ser regenerados por calor, haciendo eficiente su costo.

Limpieza y composición del material de plástico y vidrio del laboratorio

Los suministros del laboratorio que son usados para la preparación, medición y almacenamiento de fluidos y otros productos de las reacciones químicas incluyen, tubos, material de vidrio y plástico. El vidrio debe ser usado para procedimientos que involucren el uso de HPLC y cromatografía gas-líquido ("Gas Liquid Chromatography" o "GLC", en inglés), ya que los solventes destruyen rápidamente el plástico.^{ref(11)} Por otro, lado muchas soluciones con pH arriba de 6 pueden atacar el vidrio, por lo tanto, las soluciones alcalinas deben almacenarse en contenidos de plástico. El vidrio también tiende a absorber iones metálicos, que podrán tal vez alterar significativamente las concentraciones de la solución estándar.

Mangueras.

Las mangueras de hule natural látex son durables y pueden ser usadas para hacer conexiones con vidrio. Sin embargo, son afectadas por el contacto con aceites, álcalis, agentes corrosivos, y agua caliente. Las mangueras de hule sintético (neopreno) pueden ser sustituidas por mangueras de látex en la mayoría de las situaciones. No debe ser usado con compuestos clorados o aromáticos.

Las mangueras de Tygon son el plástico sintético más usado, pero es más caro que las



mangueras de plástico. Es resistente a las sustancias químicas e inerte a ellas. Tiene múltiples aplicaciones, tales como en las bombas peristálticas; también se puede unir con otras mangueras, usando el proceso de soldadura caliente. Tiende a decolorarse con el paso del tiempo y a volverse quebradizo. También hay disponibles mangueras de politetrafluoroetileno (Teflón); son más caras que las mangueras de Tygon pero sirven como sustitutos en ciertas ocasiones.

Tipos de vidrios.

Hay varios tipos de vidrios disponibles comercialmente. Los cuales difieren en su fuerza de tensión, resistividad a ciertos agentes, y resistencia a la luz o al calor. La mayoría de la cristalería usada en laboratorio clínico está hecha con vidrio de borosilicato, el cual está disponible bajo las marcas de Pirex (Corning Glass Works, Corning, NY) y Kimax (Kimble Glass Company, Vineland, NJ). El vidrio de borosilicato tiene un bajo contenido alcalino térreo y está libre de contaminantes como metales pesados. Por lo tanto los líquidos pueden ser calentados en vidrio de borosilicato con una mínima contaminación. Este tipo de vidrio puede ser calentado en forma segura hasta aproximadamente 600° C por períodos cortos. En la Tabla 1-5 se enlistan algunos tipos adicionales de vidrios y sus usos.

Tipos de plásticos.

Los utensilios de plástico en el laboratorio están hechos de monómeros orgánicos polimerizados. Las propiedades de los plásticos dependen de la naturaleza del monómero y de la forma final del polímero usado para su elaboración. Los plásticos más comúnmente usados incluyen: poliolefinas (polietileno, polipropileno), poliestireno, policarbonato, politetrafluoroetileno (Teflón) y cloruro polivinílico.

Las poliolefinas son relativamente inertes desde el punto de vista químico, son resistentes a la mayoría de ácidos, álcalis y soluciones salinas. Los ácidos orgánicos y otros hidrocarburos causan hinchazón del plástico. El ácido sulfúrico concentrado ataca al polietileno a temperatura ambiente. El polietileno es usado en la mayoría de los productos de plástico desechable y no puede ser esterilizado. El propileno puede ser esterilizado.

El policarbonato es más fuerte que el polipropileno y tiene mejores tolerancias a la temperatura. Su resistencia química no es tan buena como la de las poliolefinas. Sus ventajas principales son su transparencia y resistencia a quebrarse, haciéndolo el material de elección para artículos como tubos para centrífuga.

El teflón es un plástico extremadamente inerte con una excelente tolerancia a la temperatura (-270° C hasta 255° C) y resistencia química. Por sus propiedades impermeables y antiadhesivas, es un excelente material para las barras magnéticas, tapas de recipientes, llaves de paso, y mangueras. Es uno de los materiales más deseables para ser usado en sistemas de distribución de agua, sin embargo, es considerablemente más costoso que otros plásticos usados para el mismo propósito. Aunque es fácil de lavar y secar, se ralla y deforma con facilidad.

El cloruro polivinílico es un plástico suave y flexible, pero poroso, frecuentemente se usa para mangueras, particularmente en sistemas de agua como reactivo. Sus inconvenientes han sido discutidos en la sección de agua como un reactivo.

En la Tabla 1-6 se resumen las características de algunos plásticos comúnmente encontrados en los productos de laboratorio.



A menudo los utensilios de plástico deben usarse en lugar de los de vidrio, porque los plásticos no liberan iones en la solución y son irrompibles. Sin embargo, algunos plásticos como el polietileno son porosos y la evaporación puede ser un problema. Por lo tanto no es recomendable el almacenamiento de recipientes de plástico parcialmente llenos. Además, el polietileno y otros plásticos pueden absorber proteínas y otros compuestos, tales como colorantes, manchas, y algunas sales, resultando en problemas analíticos. No obstante, los recipientes de plástico son preferibles para ser usados en análisis de elementos traza. Las pequeñas cantidades de los elementos trazas en los plásticos pueden ser removidos sumergiendo el plástico en HCl 1 M y enjuagándolo con agua purificada para eliminar la contaminación con elementos traza. Para pruebas analíticas aún más sensibles, el plástico puede sumergirse en HNO₃ 1 M (de mayor pureza) y enjuagarse con agua purificada. Deben evitarse tiempos prolongados de inmersión (>8 hr) en ácido ya que esto hace al plástico quebradizo. El plástico también puede limpiarse con alcohol, álcalis o álcalis alcohólicos para remover trazas de contaminantes orgánicos que contribuyen a la absorción de los elementos traza.

Limpieza de los utensilios de plástico y vidrio.

Todo el material de vidrio debe ser lavado completamente antes de ser usado en procedimientos analíticos. Un material sucio puede conducir a una contaminación química. Además, si el material de vidrio no está limpio, la superficie del vidrio no estará uniformemente húmeda, causando errores volumétricos debido al drenaje incompleto de los artículos dispensadores o habrá una distorsión en los meniscos de aforo.

Los utensilios sucios deben ser enjuagados inmediatamente después de su uso y ser sumergidos ya sea en un detergente de solución débil o en una solución de cloro al 10%. Cualquier bandeja donde se haya dejado material contaminado debe manejarse separadamente para evitar exposiciones involuntarias a los agentes contaminantes. Hay un gran número de agentes limpiadores disponibles para lavar material de vidrio y plástico del laboratorio. Algunos artículos, como las pipetas, requieren de una inmersión adicional antes de ser lavadas. En varias instituciones el lavado del material de vidrio se lleva a cabo por medio de una lavadora automática. Los fabricantes de lavadoras automáticas generalmente recomiendan el uso de detergentes específicos. En general, se usan los detergentes libres de metales que son no-iónicos y que no están altamente alcalinizados. La lavadora debe estar equipada con ciclos de enjuague con agua purificada para evitar la contaminación. Si los utensilios son lavados manualmente, deben enjuagarse completamente con agua de la llave y después enjuagarlas 5 veces con agua purificada preferentemente de tipo I. Cuando el material de vidrio está limpio, el agua purificada drena como una capa continua, mientras que los recipientes mal lavados pueden tener pequeñas gotas de agua adheridas en su superficie. Después del secado, la presencia de manchas indica que el material de vidrio está sucio, posiblemente debido a un enjuague inadecuado. Este procedimiento no es recomendable para plásticos impermeables.

Los restos de detergente en el material de vidrio se pueden identificar enjuagando un artículo de vidrio con un colorante en solución acuosa diluida (20 mg/L) como la sulfobromoftaleína (Bromosulfophtalein, "BSP", en inglés) o algún otro indicador ácido-base o midiendo el pH del agua purificada con la que se enjuagó el material.

Como se dijo previamente un lavado ácido puede ser necesario en algunos casos. Preferentemente use HCl o HNO₃ (1 M) diluidos. El uso del ácido crómico ha sido



descontinuado para este procedimiento debido a la contaminación residual y a los riesgos en su manejo y preparación

Los limpiadores ultrasónicos pueden ser usados para suplementar la acción de los detergentes. Estos pueden ser particularmente útiles en la limpieza de los utensilios cubiertos con proteínas.

Tanto el material de vidrio como el de plástico deberá ser secado, ya sea a temperatura ambiente o a temperaturas menores de 100° C, evitando así la degradación del plástico y cambios en los volúmenes designados al material de vidrio. Sí se usan solventes para ayudar al secado, éstos deben ser de alta calidad y miscibles con el agua. Cualquier gas usado también deberá ser de alta pureza.

Utensilios de Laboratorio

Vasos de precipitados.

Estos vasos (Fig. 1-1, D) son de boca ancha y paredes rectas; los hay también cilíndricos y están disponibles en vidrio y plástico. Sus volúmenes varían de 5mL a varios litros. Se usan para mezclas generales y preparación de reactivos líquidos no volumétricos.

Embudos.

El uso más común de los embudos es en la transferencia de líquidos o sólidos de un recipiente a otro. Los embudos de filtrado (Fig. 1-1,G) tienen generalmente un ángulo de 58 ó 60 grados con un tallo, ya sea largo o corto. Se usan con papel filtro para remover partículas de una solución. Varios embudos tienen crestas para incrementar la superficie de filtración. Los embudos de polvo son usados en la transferencia de sólidos (Fig. 1-1,H) tienen un tallo con boca ancha para facilitar el paso de sólidos. La superficie interna de estos embudos es lisa. Tanto los embudos de filtrado como los embudos de polvos están disponibles en vidrio y plástico. Los embudos de separación (Fig. 1-1,B) son fabricados con un orificio abierto, con un tapón de vidrio en un extremo y una llave de paso en el otro. Estos artículos son usados para extracciones manuales líquido- líquido de volúmenes relativamente grandes de muestras. La fase inferior es separada de la superior a través de la llave de paso, permitiendo la recuperación de una de ellas.

Desecadores.

Los desecadores (Fig. 1-1, J) son usados para secar o mantener secos materiales sólidos o líquidos. El desecante generalmente se coloca en la parte inferior del desecador y en un estante puesto arriba del desecante se puede apoyar el material que se desea mantener seco. La parte superior del desecador tiene una tapa de vidrio amplia y plana con un labio ancho que encaja con el borde opuesto en el fondo del desecador. Se acostumbra colocar una llave de paso engrasada en la superficie de los bordes para proveer un sello contra el paso de aire. Varios desecadores tienen también una llave de salida en la parte superior para permitir la evacuación de los desecadores. Resulta conveniente para el laboratorio contar con varios desecadores para poder almacenar materiales a diferentes temperaturas incluyendo: temperatura ambiente, de refrigeración, y de congelación. Los tipos de desecadores



disponibles están descritos en la Tabla 1-4.

Probetas Graduadas.

Las probetas graduadas son angostas, de paredes rectas y son usadas para medir volúmenes específicos (Fig. 1-1, E). Están disponibles en plástico o vidrio en volúmenes desde 5 mL hasta varios litros. Pueden estar calibradas para transferir (PT) o para contener (PC) el volumen está indicado a temperaturas específicas y las hay graduadas en subdivisiones de aproximadamente 100 divisiones del volumen total de la probeta. Algunas de ella están diseñadas con tapones que son usados para preparar soluciones no volumétricas.

Buretas.

Las buretas tradicionales son grandes, con tubos de vidrio graduado y una llave de paso en un extremo (Fig. 1-1, I). Están diseñadas para transferir exactamente cantidades conocidas de líquido en un recipiente. Midiendo de una línea graduada a otra línea graduada, se pueden dispensar fracciones de volúmenes de menos de 1mL con un alto grado de exactitud. Ahora existen buretas automáticas que son controladas por un microprocesador con una exactitud tan alta como 0.1%. Los volúmenes dispensados son monitoreados en un ordenador digital capaz de leer hasta 0.001 mL.

Matraces.

En el laboratorio se usan varios tipos de matraces; los más comúnmente usados son los volumétricos y Erlenmeyer mostrados en Fig. 1-1, F y A. Los matraces de fondo redondo son usados para evaporar muestras hasta sequedad. Los tamaños de los matraces varían desde 1 mL hasta varios litros.

Matraces volumétricos.

Son esencialmente para la preparación exacta de soluciones de concentración conocida. Las especificaciones de clase A para matraces volumétricos están definidas por el NIST e impresas en el matraz. Estas especificaciones son exactas sólo a la temperatura especificada en el matraz (Tabla 1-7). Los matraces volumétricos son usados para contener ("To Contain" o "TC", en inglés) un volumen exacto cuando el matraz se llena hasta la marca. Tales matraces por lo tanto no dispensan volúmenes exactos y no pueden usarse para transferir líquidos. La parte superior del matraz volumétrico está cubierta por una tapa delgada de vidrio o Teflón, lo cual permite la inversión del matraz sin pérdida de líquido. Estos matraces no deben ser calentados bajo ninguna circunstancia, porque puede causar la distorsión de su forma y volumen. **Los matraces volumétricos no deben ser usados para almacenar reactivos.**

Jeringas.

Estas pueden usarse para medir volúmenes exactos tales como la inyección de pequeños volúmenes de líquido para análisis cromatográfico. Hay jeringas disponibles en tamaños desde 1 hasta 500 μ L. Están hechas de vidrio y tienen un orificio perforado con precisión en el cual es colocado un émbolo que encaja justamente. La punta de la jeringa que dispensa el contenido es una aguja de metal de diámetro fino, la cual está diseñada para traspasar el tapón del recipiente a inyectar. Para las jeringas de volumen mayor de 5 μ L, los

fabricantes aseguran que la inexactitud no excede el 1% del volumen total de la jeringa y las mediciones repetidas no difieren por más del 1% del volumen dispensado. Para jeringas de volumen menor de 5 μL , la inexactitud mejor alcanzada fue del 2%. En general, las jeringas no están calibradas porque los estándares internos empleados en procedimientos cromatográficos, permiten la corrección del error. Para el trabajo en cromatografía de gas (GC) con muestras volátiles, las jeringas deben ser herméticas al aire.

Pipetas

La mayoría de las pipetas están hechas de vidrio, sin embargo hay pipetas serológicas de plástico. Hay definidas dos categorías de pipetas manuales: de transferencia (volumétrica) y de medición. Dentro de estas categorías hay tres subclasificaciones: para contener (PC), para transferir (PT), y para transferir/con soplado (PT con soplado).

Las pipetas PC o pipetas *de enjuague* deben volverse a llenar o enjuagarse con un solvente apropiado después de que el líquido inicial ha sido drenado. Estas pipetas contienen o retienen una cantidad exacta de líquido el cual debe ser transferido en su totalidad para hacer una medición exacta. Algunos ejemplos de éstas son, la pipeta de Sahli para hemoglobina y la de Lang-Levy. Ninguna de estas pipetas cumple con las especificaciones de clase A.

Las pipetas PT *con soplado* son llenadas, después se dejan drenar y luego se les sopla para dejar salir el fluido remanente en la punta. Éstas transfieren o dispensan una cantidad exacta de líquido y no se enjuagan. Las pipetas que pertenecen a este grupo incluye Ostwald-Folin y las pipetas serológicas. Son fácilmente identificables por las dos bandas esmeriladas cercanas a la boquilla de la pipeta (Fig. 1-3). Las pipetas serológicas son tubos largos de vidrio (o plástico) de diámetro uniforme. En estas pipetas las graduaciones del volumen están a lo largo de la pipeta incluyendo la punta de ésta. De esta manera la última gota de líquido que fue soplada, está incluida en el volumen transferido. Estas pipetas vienen con una punta alargada y estrechada y tienen varios tamaños del orificio de salida para controlar la cantidad de líquido transferido. Las pipetas con orificio de salida más amplio son usadas para dispensar fluidos viscosos.

Las pipetas PT son cargadas y después drenadas por gravedad. Para asegurar un drenado completo, hay que seguir la velocidad de flujo especificada por el NIST. Las pipetas deben sostenerse verticalmente y la punta debe apoyarse contra la pared del envase receptor pero sin tocar el líquido del mismo. Ejemplos de estas son: las pipetas volumétricas de transferencias, pipetas Mohr y pipetas serológicas. (Figs. 1-3 y 1-4). Las pipetas PT si cumplen los estándares de la clase A.

Las Pipetas *volumétricas* (PT) (Figs. 1-3 y 1-4) tienen un bulbo con extremo abierto, el cual sostiene la mayor parte del líquido, un tubo largo de vidrio en un extremo y con una marca o línea que indica hasta donde se debe llenar la pipeta y con la porción para transferir el líquido más afinada. Después de drenarla, esta pipeta transfiere el volumen especificado con un alto grado de exactitud (Tabla 1-8). Las pipetas *Ostwald-Folin* (PT) tienen apariencia similar a las volumétricas, pero tienen el bulbo cerca de la punta. Son usadas para la medición exacta de líquidos viscosos como sangre o suero y requieren ser sopladadas para dispensar el contenido total. Así pues, tienen bandas grabadas cerca de la parte superior. Para asegurar la transferencia completa de fluidos viscosos, el líquido es soplado después que la pipeta ha sido drenada libremente por gravedad hasta la última gota.

Las Pipetas *Mohr* (PT) son uniformes en diámetro, con el extremo de transferencia afinado. Las graduaciones están insertadas en el tallo a intervalos uniformes, así que la calibración ocurre en la parte superior pero no incluye la punta. La exactitud establecida para estas pipetas es válida solo cuando la pipeta esta llena. Si se dispensan volúmenes menores, la exactitud decrece proporcionalmente. Las pipetas Mohr con puntas largas se usan para dispensar líquidos en recipientes pequeños. Estas pipetas son menos exactas que las pipetas comunes de punta afinada. Las pipetas Mohr nunca deben ser utilizadas como si fueran del tipo de soplado. La exactitud de éstas y otras pipetas están resumidas en la Tabla 1-8.

Micropipetas

Las *micropipetas* contienen o dispensan pequeños volúmenes de líquido empezando por 1 μL hasta 1,000 μL . Las micropipetas reusables de vidrio ya no se usan en el laboratorio clínico, sin embargo, sus características están descritas.[ref\(12\)](#) Ahora existen tubos desechables, baratos, y con demarcaciones para volúmenes específicos. Éstas se llenan por capilaridad y el líquido es forzado a salir por medio de un bulbo parecido al de los goteros.

El tipo más común de micropipetas es la semi-automatizada que usa el desplazamiento de aire o desplazamiento positivo para dispensar el líquido contenido. Hay algunos modelos disponibles con ajustes digitales del volumen a usar. Existen varias marcas de pipetas de desplazamiento de aire, pero todas son operadas por pistones. Se coloca una punta desechable e intercambiable de polipropileno al final de la pipeta y entonces se carga el líquido y se dispensa a través de esta punta desechable (Fig. 1-5). Algunos instrumentos pueden expulsar automáticamente la punta de la pipeta usada y cargar una nueva, minimizando la contaminación analítica. Existen también varias marcas de pipetas de desplazamiento positivo. Las puntas capilares pueden ser hechas de plástico, vidrio o vidrio siliconizado, y es posible reusarlas. Estas son particularmente útiles en el manejo de reactivos que pueden reaccionar con plásticos. Las micropipetas de desplazamiento positivo dispensan líquido por medio de un émbolo con una punta de Teflón que entra exactamente en el capilar. El acarreo de líquidos es insignificante en instrumentos con mantenimiento apropiado. En algunas ocasiones se usa un procedimiento de lavado entre las muestras.

La precisión y exactitud de estos aparatos es excelente si son mantenidos en forma apropiada. La recuperación de la muestra es por lo menos del 99%, con una reproducibilidad del 0.6% al 0.3% para volúmenes entre 10 mL y 500 μL . Para volúmenes menores de 10 mL los errores son significativamente mayores. Por esta razón, deben evitarse los procedimientos manuales involucrando volúmenes pequeños.

Diluidores y dispensadores

Los *dispensadores y pipeteadores manuales* son frecuentemente usados en el laboratorio para adicionar volúmenes específicos de reactivo o diluyente en forma repetida a una solución (Fig. 1-6). Hay varios tipos disponibles comercialmente, pero todos consisten en un frasco de reactivo el cual tiene anexo un émbolo con un sistema de válvula. El dispensador tiene adaptado un tubo o popote que alcanza el fondo del frasco. Éste debe ser purgado con líquido para asegurar la ausencia de burbujas de aire. Una vez purgado, al presionar el émbolo, se dispensa la cantidad seleccionada de líquido. Regresando el émbolo a su posición



original se vuelve a llenar la cámara dispensadora. Los fabricantes le atribuyen un error del 1% y una reproducibilidad del 0.1%. Los dispensadores manuales requieren limpieza frecuente para eliminar el material que pueda obstaculizar la acción del pistón.

Los pipeteadores que dispensan líquidos en forma repetitiva son útiles en el manejo de volúmenes relativamente pequeños. El volumen a dispensar se determina por el ajuste del pipeteadores y por el tamaño de la punta, tipo jeringa desechable, la cual también actúa como el reservorio del líquido.

Los *Diluidores-dispensadores automáticos* son útiles para preparar un gran número de muestras para análisis. Tales accesorios pueden ser parte integral de un analizador químico automatizado. Los dispensadores pipetea un volumen de muestra y diluyente preestablecido en un recipiente o instrumento. El dispensador de pistón doble frecuentemente usado, permite el ajuste de volúmenes de ambos; muestra y diluyente (Fig. 1-7). Una jeringa movida por un motor procesa la muestra y otra procesa el diluyente. Las jeringas son activadas por un microprocesador permitiendo que cada pistón llene las jeringas simultáneamente. Una segunda señal reacomoda las válvulas para permitir que el diluyente fluya por la jeringa de la muestra. Esto desplaza la muestra, forzándola a través de la punta de la pipeta y se enjuaga en preparación para la próxima muestra. Pueden seleccionarse varias proporciones entre muestra y diluyente, sin embargo, un volumen de 10 partes del diluyente asegura un buen enjuague y un acarreo insignificante de la muestra anterior. Se considera que el error en el volumen dispensado es menor del 0.5% mientras que la reproducibilidad es de 0.05% del volumen total de la jeringa ó 0.1% cuando se dispensa al menos el 10% del volumen de la jeringa.

Técnicas Volumétricas

Pipetas de clase A

Los procedimientos analíticos en química clínica requieren de mediciones volumétricas y transferencias exactas para asegurar la exactitud en los resultados, este trabajo requiere el uso de material de vidrio de clase A. De hecho, El Colegio de Patólogos Americanos ("CAP") especifica que las pipetas volumétricas deben ser de exactitud certificada (Clase A) o los volúmenes de los artículos deben ser verificados (por ejemplo, a través de un procedimiento gravimétrico). Además, las pipetas automáticas y artículos usados en diluciones deben ser revisados periódicamente para garantizar la precisión y exactitud. Por lo tanto, la mayoría de los laboratorios utilizan material de vidrio de clase A en forma rutinaria. Además, el material de vidrio debe ser escurpulosamente lavado para evitar la adherencia de líquido a las paredes sucias de los recipientes y pipetas resultando en mediciones inexactas. Las pipetas de vidrio de borosilicato deben ser inspeccionadas frecuentemente. Si las puntas de las pipetas están rotas o el vidrio rallado deben desecharse.

Las pipetas de clase A se llenan con la ayuda de bulbos de hule o algún artículo semejante. **Bajo ninguna circunstancia se permite el pipeteo con la boca.** El bulbo se usa para llenar la pipeta por arriba de la marca de calibración. La pipeta es sostenida con los dedos pulgar y medio, colocando el dedo índice sobre el orificio superior, para controlar al mismo tiempo el flujo del líquido (Fig.1-8). Una vez que la pipeta se ha llenado por arriba de la marca, se limpia la punta con un papel que no deje residuos para eliminar el exceso de

fluido. Entonces se deja drenar el líquido hasta que la parte inferior del menisco quede exactamente en la marca; esto se realiza con la pipeta en posición vertical, sujetándola a la altura del ojo. Se continúa sosteniendo la pipeta en posición vertical, con la punta contra la pared del vaso receptor y se drena el líquido a medida que el dedo índice va liberando el orificio de la pipeta. Las pipetas PT deben sostenerse por un tiempo suficiente (~2 seg) para permitir dispensar el volumen especificado. Con las pipetas PC o pipetas de soplar, el bulbo de hule se usa para soplar los restos de solución después que el drenado ha sido completado.

Micropipetas

Las *micropipetas de desplazamiento por aire* pueden ser usadas en dos formas, *hacia adelante o en reversa*. La forma reversa se usa solamente en sistemas con mecanismos compuestos de doble pulso o presión. La precisión de éstas en la forma hacia adelante depende del drenado preciso causado por la presión del aire y también son relativamente sensibles a las características físicas del líquido que ésta siendo pipeteado. La forma reversa de operación, por otro lado es considerablemente menos sensible al tipo de líquido que está siendo dispensado. En el funcionamiento hacia adelante el pistón es oprimido hasta el primer tope; en sistemas con mecanismos compuestos por dos pulsos, la punta se descansa en el líquido y se deja subir el pistón lentamente hasta su posición original. Este movimiento llena la punta con el volumen designado de líquido. Entonces se saca la punta deslizando por la pared del vaso de tal forma que cualquier adherencia de líquido sea removida. Si hay cualquier gotita, limpiar la punta cuidadosamente con un papel que no deje residuos, teniendo cuidado de no extraer ninguna muestra de la punta de la pipeta. Se coloca entonces la punta en la pared del vaso receptor, se empuja el pistón suavemente hasta el primer tope en los mecanismos con dos pulsos, dejando drenar el líquido. Después, se deja pasar un segundo antes de empujar el pistón hasta el segundo tope, liberando el líquido residual. Cuando se usa la forma reversa, el líquido es aspirado después que se ha llevado al pistón hasta el segundo pulso. Esto sobrecarga la pipeta con la muestra. Para dispensar el líquido, empujar el pistón hasta el primer tope y liberarlo después de esperar un segundo.

Las *micropipetas de desplazamiento positivo* se usan de la misma forma que las micropipetas con desplazamiento de aire hacia adelante. De nuevo, la limpieza cuidadosa de la punta es crucial para no tocar la parte de la muestra contenida en ella. El mantenimiento necesario para las puntas de Teflón debe ser suficientemente enfatizado. Información más detallada sobre esta técnica está publicada. [ref\(13\)](#)

Procedimientos generales para la preparación de soluciones

La preparación de soluciones requiere de mediciones exactas de solvente y soluto. El grado de exactitud requerido dictará que material de vidrio debe ser usado específicamente.

1. Medir el soluto pesándolo, pipeteándolo, o dispensándolo de una probeta o pipetear (ver ejemplos).
2. Preparar soluciones volumétricas transfiriendo cuantitativamente el soluto al matraz receptor. Si el soluto existe como una solución concentrada, usar una pipeta volumétrica para la transferencia.
3. Añadir suficiente solvente para disolver el soluto cuando sea necesario.



4. Cuando el matraz receptor es volumétrico, los sólidos o líquidos son adicionados al matraz y el diluyente se adiciona hasta aproximadamente dos tercios del volumen del matraz. La disolución del sólido o líquido puede ser efectuada agitando el líquido. Después de la disolución, se adiciona diluyente hasta que el menisco alcance la línea del grabada en el cuello del matraz, visto al nivel del ojo. Para mezclar completamente la solución hay que tapar la boca del matraz. Sostenerlo del cuello con una mano, simultáneamente hacer girar el líquido e invertir el matraz. Como alternativa, la dilución o disolución de un sólido en el diluyente puede llevarse a cabo en un matraz Erlenmeyer. Luego, la solución se transfiere a un matraz volumétrico, seguido de varios lavados del matraz Erlenmeyer con diluyente y transfiriendo el líquido usado en los lavados, al matraz volumétrico.
5. Llevar la solución a volumen después de que el soluto está completamente disuelto.
6. Si es necesario el uso de una barra magnética, sacar la barra y enjuagarla con solvente antes de llevar la solución al volumen determinado.
7. Llevar al volumen una solución solamente a temperatura ambiente.
8. Mezclar bien la solución para asegurar su homogeneidad.
9. Transferirla a un recipiente apropiado para su almacenamiento (ámbar/claro, plástico/vidrio).

Control de calidad de micropipetas, dispensadore, y diluidores

General.

La exactitud y precisión de cada micropipeta manual debe ser verificada al adquirirla y durante el curso del año. La frecuencia de la verificación dependerá de que tanto se use. Aquellas de uso constante se pueden verificar cada mes, mientras que las raramente usadas se pueden verificar un o dos veces al año, a menos que una agencia de inspección ordene una mayor frecuencia. Los fabricantes de pipetas más recientes aseguran una calibración estable por dos años. Está pendiente determinar si estas afirmaciones son aceptadas por las agencias de inspección.

El *mantenimiento de rutina* es crítico. Las pipetas de desplazamiento de aire tienen una longitud fija del tope que debe ser mantenida. Además, hay sellos para evitar el paso del aire a la pipeta cuando se mueve el pistón. Este debe ser engrasado para mantener su funcionamiento apropiado. El fabricante proveerá una guía para llevar a cabo el mantenimiento. Cualquier parte gastada debe ser reemplazada y las pipetas que no cubran las especificaciones de precisión y exactitud, generalmente requerirán servicio por parte del fabricante.

Las pipetas de desplazamiento positivo, necesitan prácticamente el mismo mantenimiento con respecto a la verificación del resorte y reemplazamiento de las puntas de Teflón. Muchos de estos artículos también se suministran con alambre deslizante para hacer una rápida verificación del émbolo. Estas revisiones no deben ser usadas en lugar de las verificaciones de rutina. Los fabricantes proveen de guías para realizar el mantenimiento de rutina.

Validación del control de calidad.

El método primario para la validación del funcionamiento de las pipetas es una técnica



gravimétrica.^{ref(14)} Un método secundario es un procedimiento espectrofotométrico con dicromato de potasio. El último método es inaceptable para volúmenes menores de 10 µL. El siguiente protocolo describe el método gravimétrico basado en los lineamientos del NCCLS:

Determinación del Funcionamiento del Equipo Volumétrico.^{ref(15)}

1. Asegurarse de que todos los materiales (agua, frascos pequeños para pesar y pipetas) a usar estén a temperatura ambiente
2. Todas las mediciones requieren de agua Tipo I.
3. Medir y registrar la presión barométrica y la temperatura ambiente (t) del agua a 0.1° C.
4. Para minimizar los errores de evaporación colocar una pequeña cantidad de agua en los frascos pequeños para pesar (entre 2 y 30 volúmenes de muestra o un mínimo de 0.5 mL. Cubrir (por ejemplo con un papel Parafilm o con un tapón). Asegurarse de que las manipulaciones se lleven a cabo sin tocar los frascos directamente.
5. Pesar los frascos (agua y cubierta) y registrar el peso llevándolo hasta la acotación de 0.1 mg (P_v) más cercana o tarar el peso del frasco, agua y cubierta.
6. Transferir la alícuota de agua que se va a medir al frasco de pesado, usando la pipeta en prueba. Tapar nuevamente el frasco.
7. Pesar de nuevo el frasco a la décima de mg más cercana y registrar el peso (P_l)
8. Repetir las mediciones P_v y P_l hasta obtener 10 lecturas para poder evaluar la precisión y exactitud. (Para una "verificación rápida" pueden hacerse 4 lecturas que darán una idea aproximada de la precisión)
9. Referirse a "El Manual de Física y Química"^{ref(16)} para obtener el factor de corrección para la temperatura del agua. Evaluar el factor de conversión z (µl/mg) incorporando la densidad del agua a la temperatura y presión de la prueba.
10. Calcule el volumen medido como sigue:

$$\text{Volumen Promedio, } \bar{V}_t = \text{Peso Promedio } \bar{P}_t \cdot z$$

$$\text{donde } \bar{P}_t = \bar{P}_1$$

11. La exactitud se calcula evaluando la diferencia entre el volumen promedio real medido y el volumen nominal, expresado en %:

$$\frac{\text{Volumen promedio}}{\text{Volumen nominal}} \times 100\%$$

12. La precisión se deriva de la distribución de los pesos individuales con respecto a su media y expresado en porcentaje de coeficiente de variación. (%CV).

En general, un error de 0.1% o menos en la exactitud puede ser ignorado al usar la pipeta. Los errores más grandes deben evaluarse en forma crítica y ajustar la pipeta si es necesario para lograr una mayor exactitud en el volumen. Los fabricantes pueden usar mercurio en lugar de agua para evaluar el funcionamiento de las pipetas. Esta práctica no se recomienda para un laboratorio de rutina.

El uso de radioisótopos y enzimas es inaceptable por el gran error inherente y la



escasa estandarización. Otros métodos tales como la titulación ácido-base, fotometría de flama, y colorimetría han sido sugeridas, pero todavía no hay suficiente documentación para validar estos métodos .

La exactitud de un dispensador puede también ser evaluada por un procedimiento gravimétrico. Se prepara el volumen a ser probado y la pieza se purga para eliminar la presencia de burbujas de aire. Entonces se despacha el agua cuidadosamente en un tubo prepesado y se determinan los volúmenes usando la misma ecuación de la prueba para las pipetas. Se puede obtener una idea aproximada del funcionamiento del despachador usando una probeta. Este procedimiento es útil cuando se hacen ajustes de volumen al dispensador, el cual también provee un mecanismo de verificación diaria. El procedimiento gravimétrico debe efectuarse a intervalos regulares (mensual, trimestral), dependiendo del uso del pipeteador.

Los *Diluidores automáticos* son mejor evaluados usando un método espectrofotométrico con dicromato de potasio. Se prepara una serie de diluciones ($n = 20$) con el diluidor, se miden espectrofotométricamente, y entonces se comparan con una dilución manual hecha con las mismas proporciones de volúmenes. La dilución manual debe prepararse en matraces volumétricos en volúmenes suficientemente grandes de muestra (no menos de 1 mL) para asegurar la exactitud. Se compara entonces la absorbancia de la muestra preparada usando el diluidor automático con la de la muestra diluida manualmente y se calcula la exactitud del diluidor automático de la forma previamente descrita. Debe haber una correlación del 2%. Similarmente se calcula la precisión usando la distribución individual de las absorbancias con relación a su media, expresada como %CV. El %CV no debe ser mayor del 1%. Este procedimiento puede ser usado para evaluar algunos sistemas diluidores que se incorporan a instrumentos automatizados. De nuevo, los procedimientos que involucran el uso de enzimas son inaceptables. La frecuencia de verificación se determinará por la frecuencia del uso. Las determinaciones mensuales serán suficientes para la mayoría de los materiales, incluyendo los diluidores incorporados a los analizadores automatizados.

Las pipetas, diluidores, y dispensadores deben ser reevaluados cada vez que sean sometidos a una reparación o servicio. Todos los procedimientos deben ser registrados y archivados de acuerdo a los lineamientos de las agencias de inspección federales, estatales y locales.

Unidades de medición

Unidades SI

Hay siete unidades básicas del sistema SI^{ref(17)} (Tabla 1-9). Pueden combinarse dos o más unidades básicas por multiplicación o división para las formar unidades SI derivadas (Tabla 1-10). Las unidades básicas o derivadas pueden ser muy grandes o muy pequeñas para su uso conveniente. Se permite el uso de prefijos que forman múltiplos o submúltiplos (Tabla 1-11). Se han conservado algunas unidades que no son SI (no SI) por las dificultades encontradas en su conversión a unidades SI o por la amplia difusión de su uso. Algunas unidades no-SI relevantes en química clínica y sus símbolos son las unidades de tiempo, expresadas en minutos (min), horas (h), o días (d) y las unidades de volumen, expresado como litros (L). La Conferencia General de Pesos y Medidas ("*Conferencia Générale des Poids et*



Mésures" o "CGPM", en francés) ha aprobado l, l, o L como designación para volumen, sin embargo, L es la abreviación oficial aceptada en los Estados Unidos.

Unidades SI en el laboratorio clínico^{ref(18)}

La unidad SI describe la concentración de los constituyentes del cuerpo en términos del número de moléculas disueltas, medidas en moles (mol, μmol , etc) más bien, que en términos de cantidad de masa disuelta (mg, g, etc.). Una *mol* de una sustancia química contiene el número de gramos equivalentes a la masa de su formula (ver Tabla 1-10, pág. 36). La unidad SI de actividad enzimática es el *katal*, el cual se define como la cantidad de enzima que catalizará la transformación de una mol de sustrato por segundo en un sistema de análisis. Esta terminología ha sido aprobada por la Comisión Conjunta sobre la Nomenclatura de Sustancias Químicas de la Unión Internacional de Bioquímica ("Joint Commission on Biochemical Nomenclature of the International Union of Biochemistry," o "IUB", en inglés) y la IUPAC pero no ha sido aprobada por la CGPM. Por lo tanto el uso de las unidades internacionales, UI ("IU" en inglés), para describir actividad enzimática continuará indudablemente (ver Capítulo 54). Existe una relación constante entre *katal* y UI (1 *katal* = 16.67 UI) cuando se miden bajo condiciones idénticas de temperatura, pH, y concentración de sustrato y coenzima.

Es frecuente que las unidades SI no se usen cuando el peso molecular de una proteína es incierto. Sin embargo, aún bajo estas condiciones es posible expresar la concentración de una sustancia más que la concentración de la masa, asumiendo que el peso molecular aproximado es incluido en la documentación. Esta aproximación también aplica para las hormonas; las Unidades Internacionales se usan para expresar actividad enzimática mientras que las unidades SI se usan para reportar osmolalidad. La unidad SI para reportar presión es el pascal. Sin embargo, los valores numéricos expresados en pascales para presión sanguínea y presiones parciales de gases sanguíneos son muy grandes y se prefiere usar la unidad kilopascal. Para mayor información relacionada con el sistema de unidades SI, consultar la publicación del NIST: "Guía para el Uso de Unidades del Sistema Internacional."^{ref(19)}

Mediciones de masa

La Masa puede ser definida como la cantidad de materia. El peso es una función de la masa bajo la influencia de la gravedad, como se expresa en la siguiente ecuación:

$$\text{Peso} = \text{Masa} \times \text{Gravedad}$$

Así, dos objetos de igual masa que están sujetos a la misma fuerza gravitacional tienen pesos iguales. El gramo es una unidad de masa. Las mediciones de masa o peso, se llevan a cabo usando una balanza. El tipo de balanza seleccionada dependerá de la función que se esté desempeñando. Se requieren diferentes balanzas para medir pesos en kilogramos (por ejemplo, para análisis de grasa fecal) y pesos en microgramos (por ejemplo, para preparar estándares de drogas para análisis toxicológico). Por lo tanto el laboratorio estará equipado



con diferentes balanzas para poder llevar a cabo todas las mediciones de pesos necesarias.

Tipos de balanzas

Hay dos tipos de balanzas de uso común en el laboratorio: mecánica y electrónica. Las balanzas mecánicas incluyen las variedades siguientes: balanza granataria, balanza de platillo único, balanzas de torsión, y balanzas analíticas. Los pesos que requieren menos precisión se pueden hacer con una balanza granataria o con una de platillo único. Estas balanzas han sido previamente descritas.^{ref(20)} La mayoría de los laboratorios han reemplazado las balanzas analíticas por las electrónicas. Estas pueden ser de diseño analítico o de carga superior (Fig. 1-9). Las balanzas electrónicas tienen un solo platillo que usa una fuerza electromagnética en lugar de las pesas para contrabalancear la carga colocada en el platillo. El platillo está unido directamente a un carrete suspendido en un campo con un imán permanente. Una corriente pasa a través del carrete, produciendo una fuerza electromagnética que mantiene el platillo en una misma posición. Cuando se deposita una carga en el platillo, una celda fotoeléctrica registradora, sujeta al brazo de la palanca, cambia la posición y transmite una corriente a un amplificador que incrementa el flujo a través del carrete y regresa el platillo a su posición original. Esta corriente es proporcional al peso de la carga en el platillo y produce un voltaje cuantificable que es convertido por un microprocesador a datos numéricos que indican la masa de la carga. La exactitud de una balanza electrónica depende de la linealidad del motor y del voltímetro digital. Algunas balanzas electrónicas tienen un regulador electrónico de vibración. La vibración excesiva puede ser detectada cuando se observa variación del indicador u oscilación de números en el último lugar decimal. La mayoría de las balanzas electrónicas tienen incluido un sistema para tarar el peso de los vasos a usarse los cuales se llevarán a cero. Esto tiene una enorme conveniencia cuando se quieren determinar múltiples pesos, tales como calibración de pipetas. Además, las balanzas electrónicas pueden estar en interface con un equipo procesador de datos, proporcionando así, cálculos como peso promedio y análisis estadístico de mediciones múltiples. Una balanza electrónica es al menos 5 veces más rápida que un instrumento mecánico. Cada peso es registrado en cinco segundos o menos. La Tabla 1-12 resume los tipos de balanzas y sus características de ejecución.

Requisitos de operación

Todas las balanzas deben estar localizadas en un lugar protegido del sol y de corrientes de aire que puedan interferir con el proceso de pesado. Las balanzas analíticas deben ser ubicadas en un lugar libre de vibraciones, preferentemente aisladas en una placa pesada (como el mármol). Entre más sensible sea la balanza, más críticos serán los requerimientos. Antes de usar una balanza, debe nivelarse ajustando los tornillos de las bases centrando la burbuja en el indicador de nivelación. Se debe verificar también el cero óptico. Todos los pesos deben hacerse usando papel para pesar, recipientes de plásticos, vasos de precipitados, o algún otro recipiente. Bajo ninguna circunstancia debe colocarse una sustancia química directamente en el platillo. Después de completar el proceso de pesado, todos los cristales derramados deben ser retirados del área de la balanza. Igualmente los derrames de líquidos, especialmente los



corrosivos, deben limpiarse inmediatamente para evitar que se dañen los platillos. Las pesas deben manejarse con pinzas, nunca directamente con las manos. El contacto directo con la piel deposita aceites, sales, y humedad en las pesas. Entre más pequeño sea el peso, más significativo será el error.

Procedimientos de mantenimiento

Además de los procedimientos ya descritos, las balanzas deben recibir servicio cada año como mínimo, o más frecuentemente si el uso es constante. El servicio debe ser otorgado por el fabricante o su representante. También se requieren verificaciones periódicas de exactitud en el peso como también se deben mantener registros documentando el control de calidad y procedimientos de mantenimiento. Estas verificaciones deben realizarse al menos cada mes y antes de un procedimiento analítico crítico. La verificación del funcionamiento requiere el uso de pesas NIST de clase S. EL CAP requiere que los laboratorios aprobados validen el funcionamiento de sus balanzas usando pesas de clase S.^{ref(21)} Una pesa de 100 g debe pesar 100 g \pm 0.5 mg. Las pesas clase S deben ser revisadas para verificar que sus pesos aparentes estén dentro de las especificaciones del NIST (Tabla 1-13). Un funcionamiento inaceptable indica la necesidad de servicio. Algunas balanzas modernas tienen incluida una sola pesa para llevar a cabo esta función. Tales balanzas aun requieren la verificación del resto de las pesas.

Termometría

Tipos de termómetros

Los baños de agua y placas de calentamiento deben mantenerse a temperatura constante cuando se realizan análisis sensibles a la temperatura. Los refrigeradores y congeladores deben mantenerse a temperatura constante cuando se usen para almacenar materiales sensibles a la temperatura. Los Termómetros de líquido en vidrio, termostatos, y termómetros digitales electrónicos se usan para controlar la temperatura de estos aparatos.

Diariamente, como parte de los procedimientos de control de calidad del laboratorio, debe llevarse un registro de las temperaturas de todos los aparatos utilizados en la medición de la misma, igual que cualquier acción correctiva. La exactitud de los termómetros usados para controlar el calor de los baños debe ser verificado a intervalos regulares, generalmente cada 6 a 12 meses. Se ha recomendado^{ref(22)} que el termómetro tenga un intervalo de exactitud equivalente a la mitad del intervalo deseado para el baño. Por ejemplo, si la exactitud deseada para el baño es de +0.1o C, el termómetro debe tener un máximo de incertidumbre de +0.05o C.

Los termómetros de líquido en vidrio están disponibles para inmersión total o parcial. Los termómetros de inmersión parcial se usan para medir la temperatura de los baños, placas, y hornos. La profundidad de inmersión está grabada en el tallo y se localiza aproximadamente a unos 76 mm del bulbo. Los termómetros de inmersión total se usan generalmente para verificar temperaturas de congeladores y refrigeradores, pero pueden ser sustituidos por termómetros de inmersión parcial si se verifican a la misma profundidad de inmersión a la que

serán usados en el laboratorio.

Calibración de los termómetros de líquido-en-vidrio

La calibración de los termómetros requiere el uso de un termómetro NIST certificado o de origen NIST. Como parte del programa del NIST de Materiales Estándares de Referencia (SRM), hay termómetros certificados que pueden ser usados para calibrar termómetros a 0o C y en un intervalo de 24o C a 38o C. Los termómetros que se rigen por el NIST tienen un intervalo de operación más amplio. El siguiente procedimiento establece las etapas necesarias para validar los termómetros no certificados y está basado en los estándares del NCCLS: “Temperatura de los Baños de Agua y su Calibración y Instrumentos y Sensores de Temperatura.”[ref\(23\)](#)

1. Verificar que la columna de mercurio esté libre de segmentos o burbujas. (Si hay alguna presente, consultar los estándares del NCCLS para el procedimiento de corrección del problema).
2. Hacer una determinación en hielo.[ref\(24\)](#) Con esto serán verificados los cambios de volumen en el bulbo. Después de realizar este procedimiento dejar el termómetro afuera por unos cuantos días para asegurar una recuperación del bulbo
3. Ajustar el baño a la temperatura requerida para el análisis. Es importante que el volumen del baño sea al menos 100 veces mayor que el volumen del fluido en el cual el termómetro está siendo calibrado. Eso asegurará el mantenimiento de una temperatura uniforme en el baño.
4. Colocar el termómetro de referencia y el no certificado en tubos de ensayo llenados con agua, hasta la profundidad apropiada. Los termómetros deben colocarse uno cerca del otro pero con suficiente espacio entre ellos para asegurar la circulación en el baño.
5. Si se está calibrando un termómetro de inmersión total para ser usado como de inmersión parcial, éste debe ser sumergido en el baño a la misma profundidad usada en la aplicación de las pruebas. La inmersión apropiada del termómetro es esencial.
6. Después de alcanzar el equilibrio térmico (el cual necesitará de varios minutos para los termómetros de líquido en vidrio), determinar la lectura de las temperaturas para ambos termómetros.
7. Los termómetros electrónicos que usan sondas de termostatos pueden ser calibrados de la misma forma. El equilibrio térmico de éstos ocurre en pocos milisegundos.

Los termómetros que tengan una diferencia de más de 1° C con respecto al termómetro de referencia deben ser desechados o devueltos al proveedor. Se requiere de una concordancia del 0.1° C para propósitos críticos, como el análisis de enzimas. Si las discrepancias son entre 0.2° C y 1° C, el termómetro puede ser usado para funciones menos críticas tales como monitoreo de hornos, refrigeradores, y congeladores. Asignar a cada termómetro un número de registro y enlistar éste y los resultados de la calibración en un libro de registro de termómetros lo cual será útil para propósitos de inspección.

También está disponible, a través de NIST, una celda de punto de fusión de galio que puede ser usada para calibrar las sondas de termostatos electrónicos a temperaturas de 29.772° C. Estas sondas pueden ser usadas para verificar la exactitud de los termómetros de líquido en vidrio en un intervalo de 20° C a 40° C.[ref\(25\)](#)



Baños de agua, placas térmicas, y hornos

Los baños de agua pueden ser diseñados con o sin circulación. Para aplicaciones en química clínica, los baños sin circulación son, en general, inaceptables porque el control de la temperatura es inadecuado ($\pm 1^\circ \text{C}$), por lo tanto son necesarios los baños con circulación los cuales tienen un estricto control de temperatura. Tales baños están equipados con una bomba interna o externa de circulación que mantiene un adecuado equilibrio térmico. En algunos casos, la bomba puede ser acoplada a una unidad de refrigeración para proveer un control de temperatura por debajo de la temperatura ambiente. El agua usada en el baño debe ser de tipo II (o tipo I) a la cual se le adiciona un agente bactericida tal como el thimerosal (Merthiolate) a una dilución de 1:1000. El agente bactericida controla el crecimiento bacteriano, reduciendo la frecuencia con la cual debe ser cambiada el agua del baño. El uso de agua de alta calidad es necesario para controlar el depósito de sales en las resistencias, ya que estos depósitos interfieren con el mantenimiento y el adecuado control de la temperatura.

Las placas térmicas de metal son menos eficientes manteniendo una temperatura constante y generalmente operan dentro de $\pm 0.5^\circ \text{C}$. Las placas que están incorporadas al compartimiento de la celda en un espectrofotómetro operarán con más exactitud, generalmente $\pm 0.2^\circ \text{C}$ o mejor.

La temperatura de los baños de agua y placas térmicas deben ser medidas diariamente con un termómetro calibrado contra un termómetro NIST o con un termómetro certificado por el NIST. Todas las mediciones y acciones correctivas deben registrarse.

El laboratorio puede usar los hornos para secar sustancias químicas, extractos, medios de soporte electroforético, placas de cromatografía en capa fina, y material de vidrio. Para la mayoría de los propósitos, un control de temperatura de $\pm 1^\circ \text{C}$ es adecuado. Los termómetros usados para monitorear la temperatura de los hornos deben verificarse al menos cada año. La temperatura del horno debe medirse diariamente para detectar mal funcionamiento en los elementos de calefacción o en los controles del termostato. También se debe revisar la integridad de todos los empaques. Se deben reemplazar los empaques gastados para asegurar un adecuado control de temperatura. Todas las mediciones y acciones correctivas deben registrarse.

Centrífugas

Tipos de centrífugas

Existen tres tipos de centrífugas: *de cubo giratorio o cabezal horizontal, de ángulo fijo o cabezal angular, y ultracentrífugas*. Hay modelos para mesa o para piso, permitiendo al laboratorio comprar la que mejor cubra sus necesidades.

Las centrífugas se usan en el laboratorio clínico para separar sustancias de masas o densidades significativamente diferentes. Las dos sustancias a ser separadas pueden ser sólido (partículas) y un líquido o dos líquidos de diferentes densidades. Las centrífugas se usan especialmente para separar sangre coagulada o células del suero y plasma o fluidos corporales.



Aunque la elección específica de una fuerza centrífuga relativa (“Relative Centrifugal Force” “RCF” en inglés) para llevar a cabo estas separaciones no es crítica, se recomienda una fuerza de 1000 a 1200 x g por 10 ± 5 min.^{ref(26)} En algunos casos, puede ser necesario más tiempo (ver Capítulo 3).

Los instrumentos de cubo giratorio o cabezal horizontal, tienen los rotores que mantienen los tubos en posición vertical cuando la centrífuga está en descanso; los tubos se mantienen en una posición horizontal cuando el rotor está en movimiento. Durante la centrifugación, las partículas se mueven constantemente a lo largo del tubo mientras éste está en posición horizontal, distribuyendo el sedimento uniformemente contra el fondo del tubo. Después de que la centrifugación se termina y el rotor deja de dar vueltas, la superficie del sedimento presenta con una columna de líquido sobre él.

Los rotores de ángulo fijo mantienen los tubos a un ángulo específico, de entre 25 a 52 grados del eje vertical de rotación. Durante la centrifugación, las partículas se mueven a los lados del tubo para formar un sedimento que se acumula contra los lados y el fondo del tubo. La superficie del sedimento en este caso es paralela al eje de la centrífuga. Como el rotor va disminuyendo su velocidad y luego se detiene, la fuerza de gravedad puede causar que el sedimento se deslice hacia la parte inferior del tubo formando una escasa placa de sedimento. Los rotores de ángulo fijo son usados cuando se requiere una sedimentación rápida de partículas pequeñas. El diseño de estos rotores es más aerodinámico, permitiendo su operación a velocidades más altas que aquellas que se pueden alcanzar con un rotor de cubo giratorio. Esta característica permite a las centrífugas para microhematocrito operar entre 11,000 y 15,000 revoluciones por minuto (rpm) con una RCF de hasta 14,000 x G.

Las ultracentrífugas son centrífugas de alta-velocidad que usan un rotor de ángulo fijo o rotor de cubo giratorio. Frecuentemente cuentan con sistema de refrigeración para contrarrestar el calor generado como resultado de la fricción. Existe también una ultracentrífuga pequeña manejada por aire, la Airfuge (Beckman Instruments, Spinco Division, Palo Alto, CA 94304) con una turbina de aire en miniatura con un pequeño rotor operando de 90,000 a 100,000 rpm, generando una RCF máxima de 178,000 x g. Este tipo de centrífuga ha sido usado para separar quilomicrones de suero, permitiendo llevar a cabo un análisis exacto en un infranadante claro. También, ha sido usada para fraccionar lipoproteínas, realizar análisis de fijación de drogas, y preparar tejido para análisis de receptores hormonales. Las ultracentrífugas analíticas se usan para determinar los coeficientes de sedimentación de las proteínas, permitiendo la determinación de pesos moleculares.

Componentes de una centrífuga

Todas las centrífugas tiene un motor, un eje, y una cabeza o rotor, que pueden estar en la forma de una cámara con una cubierta. Los componentes que permiten el control de la centrífuga son un interruptor de corriente, marcador de tiempo, tacómetro, y freno. Cuando se necesita, se incluyen unidades de refrigeración. Algunas centrífugas están equipadas con una alarma que suena cuando existe algún problema en su funcionamiento, como en el caso de tubos no balanceados. Algunas centrífugas se apagan automáticamente, evitando la ruptura del tubo y la exposición a agentes potencialmente infecciosos. Todas las centrífugas tienen una cerradura de seguridad que evita que el operador abra el instrumento antes de que el rotor



se haya detenido.

Los rotores de cubo usan pares de transportadores o soportes que rotan libremente. Los soportes están diseñados para aceptar una variedad de cubiertas protectoras, permitiendo la centrifugación de tubos pequeños o grandes. Se requiere de diferentes rotores de ángulo fijo para diferentes tamaños de recipientes.

El motor de una centrífuga grande es generalmente de: corriente directa (DC), de uso intensivo, de alta fuerza de rotación, o de motor eléctrico. En centrífugas más pequeñas, la corriente es alterna (AC). La energía es transmitida al rotor por el conmutador y las escobillas. El eje del rotor es manejado por un sistema de giro y los soportes están sellados, minimizando así, la vibración y la necesidad de lubricación. La velocidad de la centrífuga es controlada por un potenciómetro que modula el voltaje suministrado por el motor. La velocidad también se determina por la cantidad de carga en el rotor. El tacómetro mide la velocidad del rotor en revoluciones por minuto (rpm). El freno desacelera el rotor retrocediendo la polaridad de la corriente al motor. El medidor de tiempo permite al rotor alcanzar una velocidad programada; entonces el rotor se desacelera sin frenar después de que ha transcurrido el tiempo señalado.

Las centrífugas refrigeradas se usan cuando el calor generado durante la centrifugación pudiera causar evaporación o desnaturalización de la proteína o fuga de componentes celulares en la muestra. La temperatura puede ser controlada entre -15°C y 25°C , permitiendo centrifugaciones a más altas velocidades y por períodos más prolongados.

La selección de los tubos y botellas para la centrífuga es importante. Los tubos de plástico (poliestireno, polipropileno) tienen una tolerancia más alta a la velocidad y pueden resistir una RCF de hasta $5,000 \times G$. Los tubos con fondo cónico permiten la formación de un sedimento más compacto y son útiles en la preparación de la orina para análisis microscópico y para algunos procedimientos de radioinmunoanálisis. Los tubos deben descansar bien ajustados en los soportes; los tubos pequeños en un soporte muy grande producirán un sedimento poco compacto. La parte superior del tubo no debe sobresalir del soporte ya que puede llegar a impedir su movimiento. El balance de los tubos dentro de los soportes es crítico. Las centrífugas modernas automáticamente se desaceleran y luego se apagan cuando los soportes no están balanceados. La Fig.1-10 muestra un balance apropiado. Un balance incorrecto puede causar que la centrífuga vibre destruyendo la placa del sedimento. Cuando sea posible, los tubos que contienen materiales biológicos peligrosos deben ser centrifugados con las tapas puestas para minimizar los aerosoles.

Mantenimiento y aseguramiento de la calidad

Es crítica la limpieza diaria de las superficies internas de la centrífuga con una solución de cloro al 10% o un desinfectante equivalente. Cuando ocurre ruptura de tubos, las partes de la centrífuga que tienen contacto con la sangre o cualquier otro agente infeccioso deben descontaminarse inmediatamente. La tina de la centrífuga debe limpiarse con un agente desinfectante y las cabezas del rotor y su contenido deben someterse al autoclave. Todos los vidrios o plásticos rotos deben ser retirados y eliminados apropiadamente.

Las velocidades de las centrífugas que son usadas en forma rutinaria deben ser verificadas periódicamente usando un tacómetro confiable, generalmente cada tres meses de



acuerdo con las reglas de inspección del CAP.^{ref(27)} La variación en velocidad no debe ser mayor del 5% bajo condiciones específicas. La exactitud del medidor del tiempo en la centrífuga también debe revisarse y verificarse cada tres meses. Las temperaturas de las centrífugas refrigeradas deben ser revisadas al menos cada mes (es preferible diariamente) bajo condiciones normales. La concordancia entre las temperaturas medidas y las esperadas (o programadas) debe estar dentro de 2° C.

Deben seguirse las recomendaciones de los fabricantes para el mantenimiento, lubricación, y reemplazo de escobillas. La omisión en el reemplazo de escobillas gastadas puede conducir al deterioro del motor y requerir su reposición. Todas las revisiones deben ser registradas y las medidas correctivas documentadas.

Principios de centrifugación

La velocidad de una centrífuga se expresa en revoluciones por minuto (rpm), mientras que la fuerza centrífuga relativa (RCF) generada se expresa como un número de veces la fuerza gravitacional, *G*. La relación entre rpm y RCF es expresada por la siguiente ecuación:

$$RCF = 1.12 \times 10^{-5} \times r \times (\text{rpm})^2$$

donde *r* es el radio de la camisa de la centrífuga expresado en centímetros y es igual a la distancia horizontal de el centro de la centrífuga al eje del rotor; 1.12×10^{-5} es un factor empírico. La Fig. 1-11 muestran un monograma para la determinación de las RCFs cuando el radio y las rpm son conocidos. La RCF aplicada a un tubo en un rotor giratorio puede ser considerablemente más grande que el aplicado al mismo tubo en un rotor de ángulo fijo, porque el tubo nunca alcanza una posición horizontal. Por esta razón, es preferible procesar tubos con separador de sueros en rotores horizontales que operan a RCFs más altas.

De vez en cuando es necesario duplicar las condiciones de centrifugación en dos diferentes instrumentos. Esto puede ser hecho aplicando la siguiente ecuación :

Cálculos del ajuste de la velocidad^{ref(28)}:

$$\text{rpm (rotor nuevo)} = \frac{\text{RCF (rotor original)}}{1.12 \times r \text{ (cm, rotor original)}}$$

Cálculos del ajuste del tiempo^{ref(29)}:

$$\text{Tiempo (rotor nuevo)} = \frac{\text{Tiempo (rotor viejo)} \times \text{RCF (rotor original)}}{\text{RCF (rotor nuevo)}}$$

Estos cálculos no toman en cuenta las diferencias entre los instrumentos en el tiempo necesario para alcanzar la velocidad completa o para desacelerar. Por lo tanto son necesarios algunos ajustes adicionales.



Seguridad en el laboratorio

La Administración de Salud y la Seguridad Ocupacional ("Occupational Safety and Health Administration" o "OSHA", en inglés) ha establecido dos programas para garantizar la seguridad del personal en el laboratorio. El primero, trata la exposición ocupacional a sustancias químicas peligrosas, [ref\(30\)](#) pasó a ser ley en enero de 1991, y el segundo, que trata la exposición ocupacional a microorganismos patógenos, [ref\(31\)](#) pasó a ser ley en marzo de 1992. Además de estos programas obligatorios, el laboratorio es responsable por la práctica de procedimientos generales de seguridad.

Cada laboratorio clínico es responsable por la designación de un oficial de seguridad. Este individuo también puede funcionar como oficial del programa de higiene química y coordinador del programa de microorganismos patógenos. Las responsabilidades de estos empleados incluyen la preparación y actualización de los manuales que describen procedimientos y políticas de seguridad, conservación de los registros de entrenamiento y educación continua, y el mantenimiento de los registros de exposición a materiales de riesgo. El oficial de seguridad puede también ser responsable de asegurar el abastecimiento del equipo protector, así como de que sean usados apropiada y consistentemente y que el laboratorio esté funcionando en un ambiente de seguridad para el trabajo. En una institución grande, estas funciones son compartidas por varios empleados, sin embargo, el oficial de seguridad todavía juega un papel clave para asegurar el cumplimiento de todas las regulaciones.

Seguridad general

Seguridad contra incendios es de enorme importancia en el laboratorio clínico. Todo el equipo usado para protección contra el fuego debe cumplir con los estándares de la Asociación Nacional para Protección contra Incendios ("National Fire Protection Association", o "NFPA", en inglés). El equipo, debe ser accesible a los trabajadores del laboratorio e incluye extinguidores de fuego, sábanas contra el fuego, gabinetes para almacenar solventes y sustancias químicas inflamables, alarmas de fuego, detectores de humo, y sistemas de irrigación. Es importante la selección del tipo apropiado de extinguidores así como una inspección frecuente de los mismos para asegurar que estén en buenas condiciones. Las Tablas 1-14 y 1-15 clasifican los tipos de fuegos y comparan los tipos de extinguidores. Los extinguidores de Halom son generalmente usados para áreas que en las que están las computadoras. Deben pegarse anuncios de peligro en esas áreas y proveerse equipo de protección para respirar. En un laboratorio grande serán necesarios muchos extinguidores y que sean de diferentes tipos. Todos los empleados deben familiarizarse con su uso, y es obligatorio recibir un reentrenamiento anual.

La *seguridad eléctrica* es también crítica ya que existe el riesgo de un corto circuito que resulte en el inicio de un incendio. Todo el equipo debe tener inscrito "aprobado por el laboratorio". Esto incluye extensiones de cables, los cuales pueden usarse solo como solución temporal. Todos los contactos eléctricos y equipos deben estar haciendo tierra y los cables



deben ser revisados por algún desgaste. La inspección regular evitará la posibilidad de accidente eléctricos. Deben documentarse esas inspecciones.

Cualquier equipo usado donde estén presentes solventes orgánicos debe ser dotado con entradas contra explosión tales como contactos o tomas de corriente .

El *equipo de seguridad general* incluye regaderas de seguridad y estación de lavado de ojos en cada área grande de trabajo. El programa de seguridad también debe incluir medidas rutinarias para verificar que el equipo sea operacional y se guarden registros de su mantenimiento. Se requieren de guantes de asbesto (resistentes al calor) para el manejo de equipo caliente como el material de vidrio y para el hielo seco. Otro equipo para protección del personal es abordado en las secciones que tratan los riesgos químicos y biológicos.

El plan de higiene de sustancias químicas

La OSHA ha establecido que a partir del 31 de enero de 1991, los laboratorios desarrollen un plan de higiene de sustancias químicas para la protección y educación de los empleados.[ref\(32\)](#)

Este Plan Contiene los Siguietes Elementos	
1.	Una descripción de los Procedimientos Estándar de Operación (SOP)
2.	Hojas de datos del material de seguridad (MSDS)
3.	Lista del inventario de sustancias químicas
4.	Información del almacenamiento apropiado de sustancias químicas.
5.	Requisitos de etiquetado.
6.	Una descripción de los controles de ingeniería requeridos.
7.	Una lista del equipo de protección que requiere el personal.
8.	Información sobre la eliminación de desechos
9.	Información sobre el control ambiental, cuando sea apropiado.
10.	Requisitos de limpieza.
11.	Requisitos exámenes físicos y consultas médicas para los empleados.
12.	Requisitos de entrenamiento.
13.	Requisitos en el mantenimiento de archivos.
14.	Designación de un Oficial y un Comité de Higiene Química .
15.	Otra información considerada necesaria para garantizar la seguridad.

Procedimientos estándares de operación (“Standard Operation Procedures” o “SOP”, en inglés)

Estos procedimientos incluyen los protocolos para el manejo de accidentes y derrames



de sustancias químicas. En general, si las sustancias químicas han estado en contacto con los ojos o la piel, lavar con cantidades abundantes de agua seguido por atención médica si es necesario. Los procedimientos de lavados de ojos requieren una duración de 15 minutos por lo tanto son inaceptables las estaciones portátiles de lavados de ojos. Los procedimientos de limpieza para cada sustancia química, así como la ropa protectora necesaria, deben ser definidos individualmente.

También deben definirse las reglas para evitar la exposición innecesaria a sustancias químicas. Fumar, comer, beber, o aplicar cosméticos está prohibido en las áreas de trabajo. El cabello largo y la ropa suelta deben estar bien sujetados; se prohíben zapatos abiertos o de lona. No usar lentes de contacto en el laboratorio ya que interfieren con un apropiado lavado de los ojos cuando ocurre un accidente. Además, los lentes de plástico pueden ser dañados por los vapores orgánicos, conduciendo a infecciones oculares crónicas. Se debe enfatizar el lavado de manos después del manejo de sustancias químicas y antes de salir del laboratorio con el propósito de comer o tomar algo.

El material de vidrio agrietado o astillado debe ser desechado inmediatamente ya que puede romperse durante su uso. Todo el material de vidrio que ha estado en contacto con sustancias tóxicas o corrosivas debe ser bien enjuagado con agua o alcohol antes de ser colocado con el resto del material sucio.

Se requiere que el laboratorio mantenga un archivo actualizado en orden alfabético con las Hojas de Datos sobre la Seguridad de Materiales ("Material Safety Data Sheet" o "MSDS", en inglés) para cumplir con las leyes locales, estatales y federales del Derecho a Saber. Las MSDS son requeridas para todas las sustancias químicas, reactivos, y equipos usados en el laboratorio pero no para los agentes farmacéuticos como la aspirina.^{ref(33)} Las MSDS contienen información acerca de los riesgos tanto físicos como para la salud que presentan cada producto. El archivo debe ser accesible a los empleados y a los contratistas externos trabajando para el laboratorio.

Inventario

El *inventario de las sustancias químicas* se lleva a cabo anualmente, enlistando todos los agentes peligrosos usados y almacenados en el laboratorio. La peligrosidad de una sustancia química puede ser clasificada por el Departamento de Transporte ("Department of Transportation", o "DOT", en inglés), la Agencia para la Protección Ambiental (the "Environmental Protection Agency", o "EPA" en inglés), o por la NFPA (ver etiquetado). El inventario debe estar en orden alfabético e incluir la siguiente información para cada sustancia química: Nombre y dirección del fabricante, estado físico, cantidad almacenada, número en El Servicio resúmenes de Sustancias Químicas ("Chemical Abstract Service" o "CAS", en inglés), si se conoce, localización de almacenamiento, y cualquier otra clasificación de riesgo para la salud, fuego, reactividad, o corrosividad. Debe mantenerse una lista por separado de los compuestos carcinógenos o de los que se sospecha que pueden ser carcinógenos.

Almacenamiento de sustancias químicas

Las cantidades de sustancias químicas almacenadas en el laboratorio deben ser tanto pequeñas como prácticas. Todos los refrigeradores usados para almacenamiento de sustancias



químicas deben estar claramente marcados. Bajo ninguna circunstancia se debe guardar comida o bebidas, ni siquiera temporalmente. Para el almacenamiento de solventes volátiles serán necesario refrigeradores a prueba de explosión, claramente marcados.

Las sustancias químicas tóxicas, incluyendo a los carcinógenos, deben estar almacenados en envases secundarios irrompibles, químicamente resistentes, y en áreas bien ventiladas. Los envases deben estar etiquetados para indicar que es un AGENTE SOSPECHOSO DE CAUSAR CÁNCER o que causa ALTA TOXICIDAD CRONICA .

Los solventes volátiles en grandes cantidades deben ser almacenados en gabinetes especiales aprobados por la NFPA. Siempre que sea posible, se deben mantener estos gabinetes con ventilación exterior. El almacenamiento de los solventes volátiles en las mesas de trabajo está limitado por la clasificación de la OSHA. Esta clasificación es determinada por el "punto de inflamación" y el punto de ebullición; los solventes más los combustibles son clase IA y IB. La ubicación de esos solventes en las mesas de trabajo debe limitarse a volúmenes muy escasos, sin embargo, algunas regulaciones locales son más estrictas. Las cantidades grandes deben ser transferidas a latas de seguridad dotadas con un conducto surtidor. Todos los gabinetes donde se guarden solventes deben ser apropiadamente etiquetados.

Los cilindros de *gas comprimido* se usan frecuentemente en el laboratorio. Los gases más comúnmente usados son oxígeno, hidrógeno, nitrógeno, helio, dióxido de carbono, y en menor grado, acetileno y propano. Generalmente los cilindros son codificados por colores y su contenido etiquetado de acuerdo al sistema de diamantes de la NFPA. Las regulaciones de la OSHA para cilindros de gas están basadas en publicaciones de la Asociación de Gas Comprimido.²⁴ Los cilindros deben estar almacenados lejos del laboratorio en una posición vertical y segura, de preferencia en un espacio ventilado y bajo llave, resistente al fuego y con los cilindros vacíos bien separados de los que están llenos. Los cilindros siempre deben asegurarse en un carro manual para su transporte. La tapa protectora debe permanecer en su lugar hasta que el cilindro sea conectado. Aún cuando los cilindros de gas estén vacíos deben estar sujetados a la pared o al piso ya que una caída puede romper la válvula, causando la expulsión del cilindro como un torpedo. Hay que marcar cada cilindro con una etiqueta que contenga la fecha en que fue puesto en uso. Cuando un cilindro está a punto de vaciarse debe reemplazarse antes de que quede completamente vacío para evitar la contaminación con materiales externos y se debe marcar con un letrero de VACÍO. En general, los cilindros vacíos son reciclados por los proveedores. Sin embargo los cilindros chicos que contienen propano no son reciclados. Estos pueden ser desechados de acuerdo al código local para incendios.

Las válvulas de reducción de los diferentes gases no son intercambiables. Nunca se debe sustituir un regulador, con o sin adaptador, por otro. El personal del laboratorio nunca debe intentar forzar, liberar o congelar válvulas reguladoras. Todas las conexiones deben ser probadas con agua jabonosa para detectar la presencia de fugas. Las fugas pequeñas de oxígeno o nitrógeno tienen escasas consecuencias, pero las fugas de hidrógeno, acetileno u otros gases inflamables son inaceptables. Cuando se cierra un cilindro con gas inflamable, se la debe cerrar la válvula de entrada principal y permitir que el gas se queme. Entonces se cierran las válvulas de reducción. No se debe abrir la válvula de un cilindro a menos que la válvula de reducción este cerrada. Es importante recordar que el propano es más pesado que el aire y por lo tanto la fuga de una pequeña cantidad de gas puede flotar sobre las mesas de trabajo e iniciar una flama en cualquier lugar. Por esta razón, son más seguros los cilindros



pequeños para ser usados una sola vez.

Requisitos de etiquetado y manejo

La regulación de OSHA, 29 CFR 1910.1450^{ref(34)}, define los requisitos específicos de etiquetado. Las etiquetas originales de las sustancias químicas no deben despegarse o voltearse. Las sustancias químicas que no están en su envase original, deben ser etiquetadas con la siguiente información: (1) identidad de la sustancia peligrosa, (2) ruta de entrada al cuerpo (ojos, nariz, boca, piel), (3) riesgo para la salud, (4) riesgo físico, y (5) órgano blanco afectado. Los requisitos de etiquetado se aplican a todas las sustancias químicas con una clasificación de 2 de acuerdo al sistema de clasificación del riesgo de la NFPA. Este sistema consiste en 4 pequeños símbolos en forma de diamantes agrupados dentro de un diamante más grande (Fig. 1-12). El diamante de la izquierda es azul y representa el riesgo de salud, el superior es rojo e identifica el riesgo de inflamabilidad, el diamante de la derecha es blanco e indica el riesgo de estabilidad o reactividad (usado para sustancias que son capaces explotar o de presentar un cambio químico violento, y el diamante amarillo de la parte inferior se usa para proveer información de riesgo especial como la reactividad al agua. El grado de riesgo es medido usando una escala del 0 al 4, donde 4 indica el riesgo más alto. Los materiales como alcohol isopropílico o cloro diluido en envases para despachar requerirán estas etiquetas reguladoras. Además, es deseable el uso adicional de etiquetas de alerta como las usadas por el Departamento de Transporte mostradas en la Fig.1-13.

El manejo de sustancias químicas peligrosas requiere de gran cuidado. En el capítulo 9 se presenta una discusión del manejo y eliminación de sustancias químicas radioactivas. Todos los líquidos inflamables y tóxicos deben usarse en una área con buena ventilación, de preferencia en una campana de extracción. Una campana de extracción que opera apropiadamente debe tener un flujo mínimo de aire de 150 ft³/min. Las soluciones corrosivas como los ácidos, álcalis, y sales de mercurio deben también manejarse en las campanas de extracción. Los envases con ácidos concentrados deben ser transportados con una cubierta especiales para tal propósito, evitando así el riesgo de romperlos. Debe insistirse en el uso del equipo de protección personal. Cuando se preparan reactivos con ácidos concentrados, el ácido debe ser adicionado *lentamente* al agua. Las precauciones para el manejo de carcinógenos en polvo incluyen el uso de equipo desechable y un respirador, además de otras medidas estándar de seguridad. Después de manejar el compuesto, debe limpiarse cuidadosamente el área y enjuagarse el material de vidrio con un ácido orgánico fuerte o con un solvente orgánico, antes del lavado regular.

Los *controles de ingeniería* son una parte importante de la operación diaria del laboratorio. Además de las disposiciones, inspección, y documentación del funcionamiento de los extinguidores de fuego, los lavadores de ojos, y las regaderas de seguridad, deben también monitorearse y validarse otros aspectos del ambiente del laboratorio. La calidad y cantidad de la ventilación de los cuartos (de 4 a 12 cambios de aire por hora) debe documentarse cada tres meses, así también, debe monitorearse el flujo de aire a través del laboratorio. Todas las áreas donde se hayan manejado o almacenado sustancias peligrosas tales como almacenes, cajas de guantes, y cámaras frías, deben tener una adecuada ventilación, al igual que ductos de extracción. Todas las campanas de extracción deben ser inspeccionadas después de su instalación y cada año posteriormente, por una compañía de reputación. La inspección debe



incluir una evaluación del perfil de los patrones de flujo y de la velocidad de flujo. Cualquier campana que no pase la inspección debe ser retirada del servicio inmediatamente. Debe mantenerse una lista de revisión de seguridad semanal incluyendo lo siguiente: flujo de aire adecuado, artículos innecesarios en la campana, uso correcto de la pantalla, y protección del marco de la ventana en operación. Antes de usar la campana, el operador debe confirmar su correcto funcionamiento. Ésto puede cumplirse usando un medidor permanente de flujo u observando la desaparición de humo o vapores producidos después de haber expuesto cuidadosamente dos aplicadores juntos humedecidos en amoníaco o ácido clorhídrico, respectivamente (las puntas de los aplicadores se mojan al chorro de agua antes de ser desechados). Alternativamente, se puede sostener firmemente una toalla “Kimwipe” bajo el marco de la ventana en posición baja para evaluar la fuerza de extracción. *Cuidado! no se debe permitir que se introduzca el papel dentro del sistema de extracción.*

La OSHA ha definido el equipo de *protección personal* requerido para las operaciones del laboratorio que involucren sustancias químicas de riesgo. Mucho de este equipo es idéntico al requerido para la protección contra microorganismos patógenos y será descrito en la siguiente sección. El manejo de sustancias químicas de riesgo requiere del uso de guantes (el tipo a usar dependerá de la naturaleza del riesgo de la sustancia que se maneja). Las batas protegen la ropa; es probable que alguna sustancia química de riesgo salpique imprevistamente; como prevención los delantales que cubren completamente el cuerpo ofrecen una protección adicional. Las máscaras, anteojos de seguridad con protección lateral o micas para protección facial son necesarias cuando hay un peligro potencial de contaminación para ojos, nariz, o boca. Deben proveerse respiradores y usarlos de acuerdo con los requerimiento enlistados en el 29 CFR 1910.134. Todo el equipo de protección personal debe ser retirado antes de dejar el área de trabajo.

Control de compuestos químicos y desechos

Los procedimientos para la eliminación de los desperdicios químicos y desechos de compuestos químicos de riesgo deben cumplir con todas las regulaciones locales y estatales. La EPA considera a la mayoría de los laboratorios como generadores de cantidades mínimas y se requiere que tengan un número de generación, obtenido de la oficina regional correspondiente. Ciertos compuestos químicos pueden ser desechados en el sistema de drenaje sanitario. La información específica al respecto debe obtenerse de fuentes locales, pero solo aquellos compuestos químicos que son razonablemente solubles (al menos 3%) en agua pueden ser vaciados al drenaje y éste debe ser enjuagado al menos con 100 volúmenes de exceso de agua. Los compuestos que nunca deben ser vaciados al drenaje son: solventes orgánicos con un punto de ebullición menor de 50° C, hidrocarburos, hidrocarburos halogenados, compuestos nitrogenados, mercaptanos, la mayoría de los compuestos oxigenados, compuestos que contengan más de cinco átomos de carbono (por ejemplo, freón), compuestos orgánicos tales como azidas y peróxidos, ácidos y bases concentrados, y compuestos altamente tóxicos, de mal olor, o lacrimógenos (que provocan lagrimeo).

Es responsabilidad del laboratorio determinar la eliminación de desechos químicos que salen del local. Las MSDS y otras fuentes pueden proveer información sobre la eliminación específica de desechos. [ref\(35\)](#) La incineración es una manera comúnmente aceptada desde el punto de vista ambiental para líquidos combustibles. **La colocación de sustancias químicas**



volátiles en una campana con el propósito de evaporarlas es inaceptable. El laboratorio debe estar familiarizado con las regulaciones que gobiernan el almacenamiento y eliminación de sustancias químicas tóxicas tales como solventes y formaldehído. Deben llevarse registros de la eliminación de desechos.

La **Azida de sodio**, es otra sustancia química problemática que todavía se usa como agente bacteriostático. Las azidas forman sales explosivas con un gran número de metales como el hierro y el cobre, los cuales fácilmente estallan cuando hay un shock mecánico. Aunque la cantidad de azida de sodio usada como preservativo es relativamente pequeña, su uso continuo puede producir una acumulación de las sales metálicas en las tuberías del drenaje. Estas sales son extremadamente explosivas; incluso el uso de una llave en la línea del drenaje puede resultar en una violenta explosión. Es difícil remover azidas de las tuberías. Un método involucra el cierre de la parte baja de una sección del tubo y dejarlo en contacto con una solución de hidróxido de sodio al 10%, por un mínimo de 16 horas. Se debe enjuagar entonces el tubo con abundantes cantidades de agua durante 15 minutos. El uso de azidas de sodio debe evitarse o minimizarse ya que además de ser potencialmente explosivas también son carcinógenas.

Algunos métodos colorimétricos (por ejemplo, la determinación de cloro) que usan sales de mercurio todavía están en uso, sin embargo los procedimientos que no usan mercurio han reemplazado a la mayoría de ellos. La eliminación de grandes cantidades del reactivo gastado por los analizadores automáticos que usan esos métodos pueden representar un problema ya que los desechos no deben ser vaciados al sistema de drenaje. Estos líquidos de desecho debe ser colectados en recipientes grandes de plástico y acidificados ligeramente con ácido acético y si es necesario, agregar tioacetamida (aprox. 10g/L). Se deben almacenar los recipientes en un lugar bien ventilado (puede ser que se liberen pequeñas cantidades de sulfito de hidrógeno) y con el paso del tiempo se puede precipitar el mercurio como sulfuro de mercurio. Entonces, se puede decantar el sobrenadante y vaciarse en el drenaje. La eliminación del sulfuro de mercurio debe hacerse por medio del enterramiento.

El monitoreo ambiental puede ser necesario si el laboratorio usa tres o más veces por semana alguna de las sustancias químicas definidas en la publicación OSHA 29 CFR 1910 Subdivisión Z. El formaldehído está incluido en esta lista. El monitoreo consiste en la evaluación semestral del aire de una habitación durante ocho horas, así como la evaluación de la tarjeta de identificación de uno o más empleados expuestos a la sustancia química. En el caso de que se excedan los límites de exposición permisibles, se requerirá de un monitoreo más frecuente (trimestral) hasta que se alcancen los límites de exposición aceptables. Aunque el xileno no está incluido oficialmente en la lista, se debe proceder de igual forma cuando éste sea usado.

La limpieza del piso y del laboratorio en general, debe hacerse en forma regular de acuerdo con un esquema definido; el personal de limpieza debe estar informado de los riesgos asociados con su trabajo en el laboratorio. Queda entendido que el ambiente del laboratorio debe mantenerse ordenado. Los pasillos y las escaleras deben estar libres de obstáculos, los desechos deben ser manejados en forma apropiada, los suministros del laboratorio almacenados en forma correcta, y deben limpiarse todos los derrames en la forma establecida por el reglamento. Deben estar disponibles para su uso los estuches de limpieza de derrames. Los productos con propósitos múltiples como sosa natural son útiles y también lo son los productos comerciales vendidos por compañías químicas y proveedores de productos de



seguridad (por ejemplo, J.T. Baker, Mallinckrodt Chemical Co., y Lab Safety Supply). El laboratorio puede preparar un equipo conteniendo los artículos equivalentes (guantes de hule, toallas, pala, varias sustancias químicas para neutralizar y absorber solventes orgánicos y sustancias químicas corrosivas). Los equipos deben estar etiquetados y completamente accesibles. Los derrames deben ser limpiados inmediatamente, usando el equipo de protección personal apropiado. Existen equipo especiales de limpieza para manejar derrames de mercurio y formaldehído. Los equipos neutralizan el derrame y permiten su desecho en los recipientes regulares en la mayoría de las condiciones. El mercurio derramado tiende a dividirse en gotas muy pequeñas, lo que dificulta recogerlo. Aún después de su colecta, la eliminación tiende a causar problemas, ya que el mercurio metálico no debe incinerarse o quemarse. Varios equipos para mercurio, están disponibles, por ejemplo, Mercury Absorption Disposal Kit (Aldrich Chemical Co., Milwaukee), el cual contiene material que absorbe las gotas de mercurio, produciendo una sustancia menos tóxica que puede eliminarse por enterramiento. Algunos equipos también incluyen eliminación de desechos a través del fabricante de los equipos (Merc*Clean de H-B Instrument Co.). Las mesas de trabajo y los pisos en los laboratorios viejos a menudo contienen grietas finas en las cuales el mercurio puede acumularse. Estas gotas son muy difícil de retirar, pero la grieta debe ser limpiada si es posible, ya que el mercurio es volátil a temperatura ambiente. Frotando sulfuro en polvo o polisulfuro de sodio en las ranuras puede ayudar a que el mercurio cambie a sal de sulfuro que es menos volátil.

Las regulaciones de la OSHA disponen que el personal que rutinariamente está expuesto a sustancias químicas peligrosas reciba *consulta y exámenes médicos* en forma regular (por ejemplo cada año). La extensión del examen físico depende de la cantidad y tipo de exposición. Además de una revisión regular, el personal debe ser evaluado cada que haya un derrame grande, cuando el monitoreo ambiental indica exposición por arriba de los niveles o cuando se desarrollen signos y síntomas de toxicidad. Los empleados deben ser entonces ser monitoreados y asesorados hasta que sean dados de alta. **Los expedientes médicos deben mantenerse por 30 años después de que el empleado deja el lugar de trabajo.**

La *capacitación* es una parte necesaria e importante del Plan de Higiene de Sustancias Químicas. Las sesiones de actualización se deben llevar a cabo cuando menos cada año, dejando registro documentado de los asistentes. El entrenamiento debe asegurar que el empleado conozca la magnitud de la exposición química, que entienda el sistema de etiquetado, que conozca el significado y la localización en el laboratorio de los libros con las MSDS, que este familiarizado con el equipo de protección personal requerido, y que sepa como reaccionar y manejar las sustancias en caso de derrames. Pueden usarse muchos métodos de entrenamiento, tales como métodos audiovisuales, folletos, y demostraciones.

El *mantenimiento* de expedientes es un componente crítico en el programa de seguridad del laboratorio. Los registros que deben mantenerse son: (1) reportes de incidentes y accidentes, (2) inventario y uso de sustancias de alto riesgo, (3) monitoreo ambiental donde sea apropiado, (4) consultas médicas, (5) registro de asistencia a las sesiones de capacitación, (6) procedimientos de limpieza, e (7) inspecciones de seguridad.

Protección contra los desechos de contaminantes biológicos

Precauciones universales.



La OSHA promulgó un conjunto final de reglas el 6 diciembre, de 1991, que contemplan la exposición ocupacional a la sangre y otros materiales potencialmente infecciosos. El programa para protección contra desechos biológicos fue completamente instituido el 6 de julio, de 1992.^{ref(36)} Muchos de los requerimientos son similares a aquellos contenidos en el Plan de Higiene de Sustancias Químicas, incluyendo el desarrollo de un documento describiendo lo siguiente: (1) la magnitud de la exposición para todos los empleados, (2) controles de ingeniería y trabajo práctico (3) equipo de protección personal, (4) evaluación de tareas, (5) procedimientos de limpieza, (6) procedimientos para derrames, (7) requerimientos de lavandería, (8) requerimientos de etiquetado, (9) eliminación de desechos, (10) administración de vacunas, (11) consultas médicas, (12) entrenamiento, y (13) mantenimiento de registros.

Algunas *exposiciones ocupacionales* a microorganismos patógenos son inherentes a cada tarea en el laboratorio químico. Por lo tanto todo el personal está en riesgo. Aunque éste sea el caso, es necesario definir la magnitud de la exposición.

Las *Precauciones universales*, como las define El Centro de Control y Prevención de Enfermedades ("Centers for Disease Control and Prevention", o "CDC" en inglés) y adoptados por la OSHA, son utilizadas para prevenir el contacto con la sangre y otros materiales potencialmente infecciosos.^{ref(37)} Las recomendaciones generales incluyen:

1. Todo el personal debe usar rutinariamente barreras de protección para evitar la exposición a la piel y membranas mucosas cuando se esté en contacto con sangre o fluidos corporales de cualquier paciente. Usar guantes cuando se lleven a cabo extracciones de sangre y cuando se manejen sangre, fluidos corporales, o artículos impregnados con ellos. Debe usarse protección para los ojos o pantallas protectoras de la cara durante los procedimientos en que las membranas mucosas de la boca, nariz, y ojos pueden estar expuestas al esparcimiento de gotas de sangre o fluidos corporales. Las batas (y delantales) deben ser usados durante procedimientos que generen derrames o esparcimientos.
2. Si ocurre contaminación de las manos o piel con sangre u otro fluido corporal, estas deben ser lavadas inmediatamente en forma cuidadosa.
3. Los trabajadores de la salud deben evitar lesiones por agujas, bisturíes o cualquier otro artículo con punta. Las agujas después de su uso no deben ser tapadas, dobladas, quebradas, o ser retiradas de los recipientes para la eliminación de jeringas desechables. Después de haber usado jeringas desechables, agujas, navajas de bisturí, y otros artículos con punta, estos deben ser puestos en un recipiente resistente a objetos con puntas filosas.
4. Aquellos trabajadores de la salud que tengan lesiones exudativas de la piel o dermatitis ulcerativas deben evitar el contacto directo con los pacientes, con la sangre y otros materiales potencialmente infecciosos hasta que la condición sea resuelta.
5. En particular, las mujeres embarazadas deben seguir estas reglas.

Otras prácticas de control en el trabajo incluyen las siguientes:

1. La sangre y otros materiales potencialmente infecciosos deben ser transportados en recipientes a prueba de derrames. Debe tenerse cuidado de no contaminar el recipiente ni la solicitud que lo acompaña.



2. Deben usarse gabinetes de seguridad para los procedimientos de mezclado u otros procedimientos vigorosos que puedan generar aerosoles.
3. El pipeteo con la boca está prohibido. Hay utensilios mecánicos que se usan para pipetear **TODOS** los líquidos.
4. Comer, beber, aplicar cosméticos o crema para los labios, y usar lentes de contacto, está prohibido en las áreas de trabajo con riesgo biológico, así mismo están prohibidos en la áreas donde se manejan sustancias químicas.
5. Solo se permite en el laboratorio al personal autorizado. No se recomiendan las visitas casuales. Cualquier personal relacionado con el servicio de instrumentación debe ser provisto con el equipo de protección personal necesario.
6. Los instrumentos que requieren servicio deben ser descontaminados antes de ser reparados.
7. Los analizadores químicos que generan aerosoles con las muestras deben ser equipados con micas protectoras si es posible.
8. Todos los empleados deben lavarse las manos, quitarse la bata y cualquier otro equipo de protección antes de abandonar el área de trabajo.

Equipo de protección personal.

El equipo de seguridad debe ser otorgado al trabajador en su talla apropiada y sin costo alguno para este. Las batas deben ser impermeables a fluidos, ofreciendo una óptima protección contra agentes de riesgo biológico. Los delantales pueden ser usados para proveer protección adicional. Los anteojos, máscaras, o micas son usadas para proteger ojos, nariz, y boca.

Evaluación de las tareas.

Las normas de seguridad deben ser establecidas para cada tarea llevada a cabo en el laboratorio. Estas políticas deben incluir controles de ingeniería para la práctica del trabajo y requerimientos de equipo de protección personal. Para la mayor parte del trabajo llevado a cabo en el laboratorio químico, es necesario el uso de batas, gafas de protección y guantes. Para algunas tareas se requiere de equipo de protección adicional.

Procedimientos de aseo.

Siguiendo un esquema por escrito, se debe descontaminar todo el equipo y superficies de trabajo con un germicida como por ejemplo cloro diluido al 10%: (1) Después de finalizar los procedimientos especificados, (2) cuando las superficies están ostensiblemente contaminadas, (3) inmediatamente después del derrame de cualquier material potencialmente infeccioso, y (4) al final de cada turno de trabajo.

Deben instituirse los procedimientos de limpieza rutinarios para el manejo de recipientes de basura y otros envases. La cristalería rota que puede estar contaminada se maneja usando medios mecánicos para desecharlos en forma apropiada.

Los *derrames* de material biológico se descontaminan tan pronto como sea posible con material absorbente como toallas de papel o gasas, inundando el área contaminada con cloro o frotándola con una toalla humedecida en cloro y limpiando entonces con gasas o toallas limpias. Todos los artículos contaminados son colocados en bolsas para materiales de riesgo biológico y desechados de acuerdo a los lineamientos del laboratorio. La limpieza de

derrames requiere del uso de equipo de protección personal.

La *ropa contaminada* debe ser empaquetadas en bolsas rojas en el lugar donde se usan o marcadas con el signo de riesgo biológico si se usa otro tipo de bolsa. Todo el lavado y reparación de batas de laboratorio es proporcionado por la empresa. **Bajo ninguna circunstancia pueden los empleados lavar sus propias batas.** Cuando se maneje ropa sucia deben usarse guantes. El almacenado de batas limpias y sucias debe hacerse por separado.

Las Etiquetas de alerta (Fig. 1-14) deben usarse para identificar (1) la entrada a las áreas de trabajo, (2) refrigeradores y congeladores que contienen sangre y otros agentes potencialmente infecciosos, (3) todos los envases usados para almacenar, transportar o enviar materiales potencialmente infecciosos, y (4) botes para desechos regulados (diferentes de las bolsas rojas). Las áreas donde se almacena comida deben ser marcadas como de no riesgo biológico (limpias).

Disposición de desechos.

Los desechos médicos regulados (desechos infecciosos) deben ser eliminados de acuerdo con las regulaciones locales y estatales. [ref\(38\)](#) Los materiales contaminados deben ser clasificados al momento de uso en categorías tales como objetos con agujas y otros objetos filosos. Los recipientes deben ser a prueba de fugas y cerrados cuando el contenido llegue a 3/4 de su capacidad. Cualquier desecho de riesgo biológico que se desinfecta por medio del autoclave está exento de estas regulaciones, y puede ser eliminado por los procesos estándar. Hay ahora varios sistemas disponibles para el tratamiento de desechos que los reduce a un producto irreconocible; estos incluyen procesos de pulverización o alto calentamiento. La legalidad de los mismos es determinada por cada estado.

Vacunación.

Deben ofrecerse vacunas contra hepatitis B (HBV) a todos los empleados sin costo alguno. Cualquier empleado que se niegue a ser vacunado debe firmar una hoja indicando que entiende el riesgo continuo a la exposición de microorganismos patógenos. Estos empleados son libres de cambiar de opinión en cualquier momento y recibir la vacuna. La administración de esta vacuna es en una serie de tres dosis durante un período de seis meses. Los niveles protectores de anticuerpos son inducidos en el 90% a 99% de los adultos, sin embargo, estudios de seguimiento durante 3-5 años después de la vacunación han demostrado en varios individuos, que ya no hay títulos cuantificables. Estos individuos deben recibir una sola dosis de refuerzo. No se ha sugerido un seguimiento más prolongado.

Las *Consultas médicas y evaluaciones* deben ser provistas si un empleado es expuesto a agentes de riesgo biológico a través de una aguja o una herida, exposición de membranas mucosas (ojos, nariz, o boca) o una exposición que involucre contacto de la piel con grandes cantidades de sangre. Se investiga el origen del paciente y se le pide autorización para hacerle análisis de HBV y HIV, si es necesario legalmente. Cuando no se requiere el consentimiento se lleva a cabo el análisis y se informa al empleado de los resultados. La sangre del empleado se colecta y se analiza tan pronto como sea posible. Si el empleado no acepta el análisis para HIV, la muestra se guarda al menos por 90 días por si éste cambia de opinión.

Cuando ocurren exposiciones de alto riesgo con pacientes que se sabe son HIV positivo o pacientes con alto riesgo de ser HIV positivos se procede como emergencia. Los medicamentos como la azidotimidina, AZT, deben administrarse, preferiblemente dentro de las



4 horas posteriores a la exposición.

Debe realizarse el seguimiento del empleado expuesto, incluyendo la determinación del antígeno y el anticuerpo, orientación, y profilaxis posterior a la exposición. El empleado es analizado de nuevo a las 6, 12, y 26 semanas después de la exposición si el paciente es HIV positivo o sujeto de alto riesgo.

Capacitación.

Todos los empleados requieren sesiones específicas de capacitación para asegurar que ellos entienden la epidemiología de las enfermedades hematológicas y sus modos de transmisión. Es esencial una explicación acerca de los tipos y el uso apropiado del equipo de protección personal, así como de procedimientos de emergencia a seguir en casos de exposición. Todos los empleados deben estar familiarizados con las políticas de protección contra la transmisión de microorganismos patógenos. La adherencia a las políticas debe ser monitoreada regularmente y cuando se encuentren fallas evidentes proveer asesoría o reentrenamiento.

Los *expedientes* de los empleados vacunados contra HBV son obligatorios. Además, los resultados de los exámenes físicos y consultas debe ser guardados . **Todos estos registros deben mantenerse por la duración del empleo más 30 años.**

La documentación de las sesiones de capacitación se mantiene por tres años y se incluye la fecha de todos los programas un resumen del contenido de cada uno de éstos, nombres y calificaciones de todos los instructores, y una lista de asistencia incluyendo nombres y puestos de trabajo.

El control de calidad de todos los procedimientos de seguridad está definido por la OSHA y es un aspecto importante en el desempeño del trabajo en los laboratorios de hoy. Todos los registros que cubren higiene química y protección de riesgo biológico deben ser fácilmente accesible y cuidadosamente mantenido para cumplir con las regulaciones gubernamentales.

Parte II: Cálculos en química clínica^{ref(39)}

ELIZABETH ANN BYRNE

Diluciones

En varias áreas del laboratorio, resulta necesario diluir sangre o fluidos corporales para preparar una concentración cuantificable. La preparación exacta de estas diluciones es obligatoria para el reporte de las concentraciones reales de los constituyentes en los fluidos corporales. El diagnóstico, pronóstico y la terapia dependen de estos resultados.

La dilución puede definirse como expresiones de concentraciones. Las diluciones expresan la cantidad, ya sea del volumen o peso, de una sustancia en un volumen final total especificado. Una dilución 1:5 contiene 1 volumen (peso) en un *total* de 5 volúmenes (pesos), esto es, 1 volumen más 4 volúmenes.

La expresión de una dilución 1:5 puede también ser indicado como la fracción común



1/5. Esta fracción permite calcular la concentración real de una solución diluida.

Ejemplo. Una solución estándar de nitrógeno de 100 mg/mL es diluida 1:10. La concentración de la solución resultante es $100 \times 1/10 = 10$ mg/mL. La ecuación más comúnmente usada para la preparación de esta dilución es:

$$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2 \quad \text{Ec.1-1}$$

V_1 es el volumen, C_1 es la concentración de la solución 1, y V_2 y C_2 son el volumen y concentración de la solución diluida. Estos pueden ser expresados como concentraciones % (peso/volumen, w/v), molaridad o normalidad. V_2 y C_2 están relacionadas en forma similar. Esta ecuación básica puede ser expresada como:

$$\frac{V_1}{V_2} = \frac{C_2}{C_1}$$

El error más común en el planteamiento de una ecuación de este tipo, es no colocar los volúmenes o concentraciones relacionados en el lugar correcto y también el cancelar las unidades que debieran permanecer.

Una práctica útil para la solución exitosa de los cálculos en el laboratorio es escribir todos los números de una ecuación con sus unidades de medida respectiva. Esto puede ser un poco más tardado pero ahorrará tiempo en la revisión de los cálculos cuando el resultado final parece ilógico o incorrecto. En un problema, cuando *no* se cancelan las unidades correctas éste no puede resolverse. Una segunda práctica útil es la reducción de fracciones a su mínimo común denominador antes de calcular los resultados.

Ejemplo. Prepare 500 ml de NaCl, 0.5 M (peso molecular del NaCl=58.5 g/mol).

$$500 \text{ mL} \times \frac{\text{Litro}}{1000 \text{ mL}} \times \frac{0.5 \text{ mol}}{\text{Litro}} \times \frac{58.5}{\text{mol}} = \frac{0.5 \times 58.5 \text{ g}}{2} = \frac{29.25 \text{ g}}{2} = 14.6 \text{ g}$$

$$14.6 \text{ g de NaCl diluidos en } 500 \text{ mL} = 0.5 \text{ M de NaCl}$$

Ejemplo. Prepare 250 mL de HCl 0.1 M a partir de una solución concentrada de HCl 1M.

$$\text{Usando } C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

Donde V_1 es el desconocido

$$V_2 = 250 \text{ mL.}$$

$$C_1 = 1.0 \text{ mol/L}$$

$$C_2 = 0.1 \text{ mol/L}$$

$$1.0 \text{ mol/L} \times V_1 = 250 \text{ mL} \times 0.1 \text{ mol/L}$$

$$V_1 = 25 \text{ mL}$$

Medir 25 mL de HCl 1 M; diluirlo a 250 mL con agua destilada. Esta solución diluida tiene una concentración de 0.1 M de HCl (el razonamiento matemático indica que una dilución 1:10 de la solución concentrada HCl 1M resulta en una concentración de 0.1 M, y por lo tanto, 25



mL diluidos a 250 mL equivale a una dilución 1:10)

Otras aplicaciones de las diluciones

Para que la concentración de creatinina en orina de 24 horas pueda ser analizada, la muestra debe ser diluida 1:5 antes de ser medida. Calcule la excreción de 24 horas si el volumen urinario de 24 horas es de 1,800 mL y la concentración de creatinina medida es de 260mg/L:

$$\text{Excreción total} = \text{Volumen total de orina} \times \text{Concentración} \times \text{Dilución.}$$

$$\text{Excreción total} = 1800 \times \frac{\text{mL}}{24 \text{ Hr}} \times 260 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \times 5 \times \frac{1\text{L}}{1000\text{mL}}$$

$$\text{Excreción total} = 2340 \text{ mg/24 hrs o } 2.34\text{g/24 hrs}$$

Ejercicios

Calcule las concentraciones (las respuestas están en el apéndice al final de este capítulo).

1. NaOH 10 M, cual está diluida 1: 20 = ___ M?
2. HCl 2 M, que está diluida 1 :5 = ___ M?
3. Glucosa 1000 mg/L, diluida 1: 10 y después 1: 2 = ___ mg/L?

Diluciones seriadas son aquellas en las cuales todas las diluciones después de la primera son las mismas. Excepciones a esta descripción general de preparación de diluciones en serie están incluidas en ciertas técnicas en serología, tales como la titulación de antiestreptolisinas.

Ejemplo de dilución seriada. Para determinar el título de antiRHO (D), el suero se diluye 1 :5 por adición de 0.2 mL de suero a 0.8 mL de solución salina, en el tubo 1. Los tubos del 2 al 8 contienen 0.5 mL de salina como diluyente. La dilución se lleva a cabo transfiriendo 0.5 mL del tubo 1 al tubo 2, e mezcla, y entonces se transfieren 0.5 mL del tubo 2 al tubo 3, continuando así hasta el tubo 8 y mezclando después de cada transferencia. La concentración de suero en los tubos disminuye por un factor de 2 por cada dilución: 1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1 :80, 1: 160, 1 :320, y 1 :640.

4. Para un título ABO, el tubo 1 contiene 0.9 mL de diluyente, los tubos del 2 al 8 contienen 0.5 mL de diluyente, 0.1 mL de suero se añade al tubo 1, y se continúa con las diluciones en serie transfiriendo 0.5 mL en el resto de los tubos. Si el último tubo que presenta aglutinación con células A es el tubo 6, ¿cuál es el título de antiA en el suero? (¿Esta es igual a la dilución en el tubo 6 = 1:?)
5. Todos los tubos para una dilución seriada contienen 0.5 mL de solución salina, 0.5 mL de suero se añaden al tubo 1, y 0.5 mL se transfieren a todos los tubos de la fila. Se añaden células de carnero a los tubos, y se demuestra la aglutinación hasta el tubo 7. ¿Cuál es el título de las aglutinaciones en las células de carnero?



Pesos y concentraciones

Definiciones y ejemplos

Concentraciones porcentuales.

Los porcentajes de concentraciones son generalmente expresadas como partes de soluto por 100 partes de solución total; *de aquí la expresión por ciento, o por cien*. El uso de concentración en porcentajes se deriva históricamente de los primeros químicos farmacéuticos. A pesar de que estos términos son usados todavía en los Estados Unidos, las grandes organizaciones (AACC, CAP) están intentando usar las unidades unificadas en el SI. Las concentraciones en unidades SI son descritas en moles por litro cuando el peso molecular de la sustancia es conocida, o como peso (masa) por mililitro o peso por litro, cuando el peso molecular es desconocido. Las unidades en el SI son usadas a través del texto cuando es necesario.

Las tres formas básicas de concentración son las siguientes:

Peso por unidad de peso (w/w). Ambos soluto y solvente son pesados, el total equivale a 100 g.

Ejemplo. 5% w/w de NaCl contiene 50 g de NaCl + 950 g de diluyente.

Volumen por unidad de volumen (v/v). El volumen del soluto líquido por el volumen total del soluto y solvente.

Ejemplo. 1% de HCl (v/v) contiene 1 mL de HCl por 100 mL (ó 1 dL) de solución.

Peso por unidad de volumen (w/v). Las expresiones más frecuentemente usadas, concentraciones de w/v son reportadas como gramos por ciento (g %) o g/dL, también como $\mu\text{g/dL}$ y mg/dL . Cuando la concentración por ciento es expresada sin especificar la forma, se asume que es peso por unidad de volumen. El uso de peso por ciento para describir concentración está siendo descontinuado por profesionales, y no es usado en este libro, con algunas excepciones. Con unidades del SI esto sería en términos de peso por microlitros (mL), mililitros (μL), o litros (L).

Ejemplo. Para preparar 100 mL de 100 g/L de NaCl; pesar 10 g de NaCl y diluir hasta un volumen de 100 mL en un matraz volumétrico.

Molaridad.

La molaridad expresa la concentración como el número de moles por litro de solución. Una mol es el peso molecular de la sustancia en gramos. Una milimol es 1/1000 de una mol. Una solución molar contiene el peso molecular en gramos de una sustancia por litro.

$$\begin{aligned}1 \text{ mol} &= 1000 \text{ mmol} \\1 \text{ mmol} &= 1000 \mu\text{mol} \\1 \mu\text{mol} &= 1000 \text{ nmol}\end{aligned}$$

Ejemplos. Una solución de NaOH 1 M (peso molecular, o PM= 40.0 g/mol) contiene un peso molecular equivalente gramo por litro, ó 40 g diluidos a 1000 mL con agua destilada. Una solución milimolar (1 mM), ó 0.001 molar (0.001 M), contiene 1 mmol/L. 1 milimol de NaOH es 1/1000 de 40 g, que es, 0.040 g (40 mg). Cuando es diluido a 1000 mL, la



concentración de la solución será 0.001 M.

Normalidad.

La normalidad expresa la concentración en términos de peso equivalente de la sustancia. El peso equivalente está determinado por la valencia, la cual refleja el número de unidades combinables o reemplazables. Una solución 1 normal (1 N) contiene 1 peso equivalente por litro. El peso equivalente de un elemento o compuesto es igual al peso molecular dividido entre la valencia.

Las relaciones de *normalidad* y *molaridad* pueden ser calculadas si sus definiciones son entendidas.

Ejemplos

HCl 1 M = HCl 1 N, ya que 1 mol de H^+ o Cl^- reacciona por cada mol de HCl.

H_2SO_4 1 M = H_2SO_4 2 N, ya que 2 moles de H^+ (esto es, equivalentes), reaccionan por cada mol de H_2SO_4 .

H_3PO_4 1 M = H_3PO_4 3 N, ya que 3 moles de H^+ reaccionan por cada mol de H_3PO_4 .

$CaCl_2$ 1 M = $CaCl_2$ 2N, ya que 2 moles de Cl^- pueden reaccionar por cada mol de $CaCl_2$.

$CaSO_4$ 1 M = $CaSO_4$ 2 N, ya que el volumen de 2 moles de electrones está disponible para reaccionar con Ca^{++} o $SO_4^{=}$.

Los pesos equivalentes son conocidos como el número de gramos de un elemento (o compuesto) que reaccionarán con otro elemento (o compuesto). Esta ley denominada ley de combinación de pesos, opera para todos los compuestos químicos.

Para simplificar los procedimientos químicos y reportes, pueden usarse factores para expresar la cantidad de un compuesto como una cantidad equivalente de otro compuesto. Este proceso puede ser nombrado *equivalencia*.

Ejemplo. Calcular la cantidad de urea si el nivel de nitrógeno de urea de un paciente es 800 mg/L. La formula de la urea es $NH_2-CO-NH_2$, y su peso molecular es 60 g/mol. El peso molecular equivalente para el nitrógeno en moles es 14 g/mol x 2 moléculas = 28. El *factor urea/nitrógeno* es determinado por la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{PM de urea (60)}}{2 \times \text{PM de nitrógeno (28)}} = \frac{x \text{ g de urea}}{1 \text{ g de nitrógeno ureico}}$$
$$28x = 60$$
$$x = 2.14 \text{ (factor)}$$

Este factor establece que 2.14 g de urea serían equivalentes a un 1g de nitrógeno de urea. Así que, 800 mg/L urea nitrógeno x 2.14 es igual a 1712 mg/L de urea. Actualmente, los resultados de urea en el laboratorio son reportados como nitrógeno de urea, ya que los métodos históricos para esta prueba en particular están basados en mediciones de nitrógeno de



urea.

El personal competente del laboratorio debe ser capaz de convertir mg/dL a mEq/L. Los equivalentes de electrolitos pueden ser calculados de la ecuación:

$$\text{mg/dL} \times 10 = 10 \text{ mg/L}$$

Ya que el peso mg/mEq es el peso milimolar en miligramos dividido entre la valencia

$$\frac{\text{mg/L}}{\text{mg/mEq}} = \text{mEq/L}$$

o

$$\frac{\text{mg/dL}}{\text{mg/mEq}} \times \frac{\text{dL}}{\text{L}} = \text{mEq/L}$$

Ejemplo. ¿Cuál es la concentración en mEq/L de cloro en suero, reportado como 250 mg/dL? Ya que el peso milimolecular del cloro es 35.5 (esto es, 1 mmol = 35.5 mg), el peso miliequivalente del cloro es:

$$\frac{\text{PM}}{\text{Valencia}} = \frac{35.5 \text{ g/mol}}{1}$$

$$\frac{250 \text{ mg}}{35.5 \text{ mg/mEq}} \times 10 \frac{\text{dL}}{\text{L}}$$

Gravedad específica.

La gravedad específica puede ser usada para determinar la masa (peso) de las soluciones. Esto relaciona el peso de 1 mL de la solución y el peso de un volumen igual de agua pura a 4° C (1 g). Un uso práctico de la gravedad específica es en la preparación de diluciones a partir de ácidos concentrados comerciales, la ecuación es la siguiente:

$$\text{Gravedad específica} \times \text{Porcentaje del análisis} = \text{Gramos del compuesto por mililitro}$$

Ejemplo. El HCl concentrado tiene una gravedad específica de 1.25 g/mL y es usado como; HCl 38%. ¿Cuál es la cantidad de HCl por mililitro?

$$1.25 \text{ g/mL} \times 0.38 = 0.475 \text{ g de HCl por mL}$$

Un error común es evitar el cambio del porcentaje determinado a su decimal apropiado; en el ejemplo anterior, 38% = 0.38



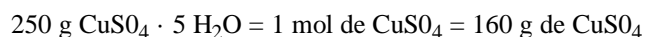
Ejercicio

6. Usando el ejemplo anterior, cuantos mililitros de HCL concentrado se necesitan para preparar 1 L de una solución 0.1 N HCl, si el peso molecular del HCl = 36.5?

Agua de hidratación.

Algunas sales están disponibles en ambas formas anhidra (sin agua) e hidratadas (con moléculas de agua). La forma disponible de la sal, incluyendo el agua de hidratación, está incluida en la etiqueta del fabricante. Para preparar concentraciones exactas de estas sales, los cálculos deben incluir las moléculas de agua presentes en el compuesto. Esto es hecho más fácil calculando el porcentaje del compuesto que está en forma anhidra. Con este porcentaje el peso de la forma hidratada puede ser corregido obteniendo el de la forma anhidra.

La ventaja de usar concentraciones molares es que el agua de hidratación *no* tiene que tomarse en cuenta para los cálculos. Por ejemplo, 1 mol de $\text{CuSO}_4 = 160 \text{ g}$ y 1 mol de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O} = 250 \text{ g}$. Un peso molecular equivalente gramo de cada compuesto contendrá 1 mol de CuSO_4 ; que es:



Ejemplo. ¿Cuántos gramos de MgCl_2 hay en 1 g de $\text{MgCl}_2 \cdot 3 \text{ H}_2\text{O}$?

Mg	24	Mg	24
Cl ₂	71	Cl ₂	71
—		3H ₂ O	54
95 PM		—	
		149 PM	

$$\frac{95}{149} = \frac{x}{1}$$

$$149x = 95$$
$$x = 63.8\%$$

Un gramo de $\text{MgCl}_2 \cdot 3 \text{ H}_2\text{O}$ contiene 0.637 g de MgCl_2 .

Fracción molar.

La fracción molar se refiere a la relación entre la cantidad de un componente y la mezcla de los componentes. La fracción molar es una unidad derivada, que es expresada ya sea como porcentaje o como decimal.

Ejemplo. ¿Qué porcentaje de magnesio está contenido en $\text{MgCl}_2 \cdot 3 \text{ H}_2\text{O}$?

Mg	=	24	24
Cl	=	35.5	— = 16.1%
$\text{MgCl}_2 \cdot 3 \text{ H}_2\text{O}$	=	149	149 =



Mg es 16.1% de la molécula $\text{MgCl}_2 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$.

Ejemplo. Determine el porcentaje molar del calcio en el carbonato de calcio (PM= 100), 1 mol de CaCO_3 contiene 100 g, entendiendo que 40 (Ca) + 12 (Ca) + 48 (3 x O), de los cuales 40 es calcio. La fracción molar de calcio en 1 L de 1 mol de carbonato de calcio es igual a 40%.

Ejemplo. ¿Cuánto $\text{SO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ debe pesarse para preparar 1 L de un solución conteniendo 80 mg de CuSO_4 ?

$$\text{PM Total de } \text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O} = 250$$

$$\text{PM de } \text{CuSO}_4 = 160$$

La proporción de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ que es CuSO_4 es $160/250 = 0.64$. Por lo tanto, 1 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ contiene 1 g x 0.64 = 0.64 g de CuSO_4 . El resto, 0.36 g, es agua. Entonces:

$$\frac{80}{0.64} = 125 \text{ mg de } \text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$$

Ejemplos de cálculos

- a. Cual es la normalidad del HCl concentrado que tiene una gravedad específica de 1.19 g/mL y un ensayo del 38%?

$$\text{Gravedad específica} \times \text{Porcentaje} = \text{Gramos/mililitro}$$

$$1.19 \times 0.38 = 0.452 \text{ g/mL} = 452 \text{ g/L}$$

$$36.5 \text{ g de HCl/L} = 1 \text{ N}$$

$$\frac{452 \text{ g/L}}{36.5 \text{ g/Eq}} = 12.4 \text{ N}$$

- b. Si 24.5 g de H_2SO_4 (PM = 98 g/mol) están disueltos en un 1 L de solución

(1) ¿Cuál es la molaridad?

(2) ¿Cuál es su normalidad?

(Respuesta 1) 1 mol de $\text{H}_2\text{SO}_4 = 98 \text{ g}$; Por lo tanto 24.5 g es igual a:

$$\frac{1 \text{ mol}}{98 \text{ g}} = \frac{x}{24.5 \text{ g}}$$

$$x = 0.25 \text{ mol}$$

$$0.25 \text{ mol en 1 L} = 0.25 \text{ mol/L} = 0.25 \text{ M}$$



(Respuesta 2) La valencia de H_2SO_4 es igual a 2; por lo tanto el peso equivalente de H_2SO_4 se expresa como sigue:

$$\text{Peso equivalente} = \frac{\text{Peso molecular}}{\text{Valencia}}$$

$$\text{Peso equivalente} = 49 \text{ g}$$

Para resolver que número de equivalentes que hay en 24.5 g

$$\frac{1 \text{ equivalente}}{49 \text{ g}} = \frac{x}{24.5 \text{ g}}$$

$$x = 0.5 \text{ equivalentes}$$

$$0.5 \text{ equivalentes en 1 L} = 0.5 \text{ Eq/L} = 0.5 \text{ N}$$

c. El peso molecular de CaCO_3 es 100 g/mol y el peso atómico del calcio es 40 g/mol; ¿cuántos gramos o miligramos se necesitan para preparar:

- (1) 1 L de CaCO_3 0.1 M?
- (2) 10 mL de 100 mg/dL de Ca^{++} usando CaCO_3 ?
- (3) 50 mg/L de CaCO_3 ?
- (4) 0.2 mEq/L de Ca^{++} usando CaCO_3 ?

(Respuesta 1) 1 mol de CaCO_3 = 100 g; por lo tanto 0.1 mol = 10 g, ya que 0.1 molar = 0.1 mol/L = 10 g/L

(Respuesta 2) El porcentaje de peso del Ca^{++} en CaCO_3 es:

$$\frac{\text{Peso atómico del } \text{Ca}^{++}}{\text{Peso molecular de } \text{CaCO}_3} = \frac{40}{100} = 40\%$$

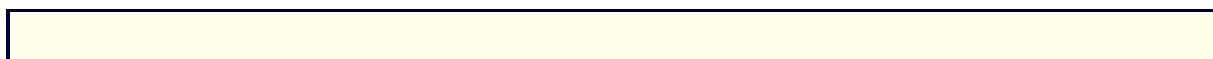
En 10 mL, se necesitan 10 mg de Ca^{++} o:

$$\frac{10 \text{ mg}}{\% \text{ de } \text{CaCO}_3} = \frac{10 \text{ mg}}{40\%} = \frac{10 \text{ mg}}{0.25} = 25 \text{ mg de } \text{CaCO}_3$$

Por lo tanto, 25 mg de CaCO_3 = 10 mg de Ca^{++}

(Respuesta 3) Se necesitan 50 mg de CaCO_3 para 1 L.

(Respuesta 4) 1 peso equivalente de CaCO_3 es igual a:



$$\frac{\text{Peso molecular del CaCO}_3}{\text{Valencia}} = \frac{100 \text{ g/mol}}{2 \text{ equivalentes/mol}} = 50 \text{ g/equivalente}$$

Para convertir a miliequivalentes

$$1 \text{ mEq} = \frac{1 \text{ Eq}}{1000}$$

$$\frac{50 \text{ g}}{1 \text{ Eq}} \times \frac{1 \text{ Eq}}{1000 \text{ mEq}} = 50 \text{ mg/mEq}$$

Calcular la cantidad para preparar 1 L de 0.2 mEq

$$\frac{1 \text{ mEq en peso}}{50 \text{ mg}} = \frac{0.2 \text{ mEq en peso}}{x}$$

$$x = 10 \text{ mg de CaCO}_3$$

Ejercicios

7. 3 M CaCl_2 (PM 111.1) = ____ N CaCl_2
8. 2N H_3PO_4 (PM 98) = ____ M H_3PO_4
9. 2 M H_2SO_4 (PM 98) = ____ N H_2SO_4
10. 250 mL de 5% NaCl contienen ____ g de NaCl
11. ¿Cuánto $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}$ debe pesarse para preparar 100 mL de CuSO_4 al 5%? (PM $\text{CuSO}_4 = 159.61$; PM $\text{H}_2\text{O} = 18$)
12. ¿Qué porcentaje de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}$ es de agua? ____ %

Cálculos basados en mediciones fotométricas (Ley de Beer)

Referirse al Capítulo 4 para una descripción de la relación entre porcentaje de transmitancia, absorbancia y concentración.

Colorimetría

Colorimetría es la medición de la clase y cantidad de luz absorbida o transmitida por una solución. Estas mediciones de absorbancia o transmitancia están relacionadas logarítmicamente. La ley de Beer (ver abajo) refleja la relación entre la absorbancia y la concentración de una solución estándar conocida con las de las soluciones de concentraciones desconocidas; las muestras de los pacientes. La ley de Beer establece que la absorbancia de



una solución está directamente relacionada con su concentración. Si la ley de Beer es verdadera, entonces:

$$C_u = \frac{A_u}{A_s} \times C_s \quad \text{Ec. 1-3}$$

C_u y A_u representan la concentración y absorbancia de las muestras desconocidas, mientras que C_s y A_s reflejan las de la solución estándar. En la preparación de un método colorimétrico para análisis en química clínica, se debe asegurar que la ley de Beer se cumpla o de otra manera esta fórmula no se puede usar. En otras palabras, esta fórmula puede ser usada sólo si la absorbancia y la concentración son directamente proporcionales, esto es, si la absorbancia se duplica, la concentración se duplica. Una curva estándar puede usarse para determinar gráficamente los valores de concentración. La preparación de una curva estándar se describe abajo.

Absorbancia y transmitancia

La *absorbancia* mide la cantidad de luz que es bloqueada o absorbida por una solución. La absorbancia es también conocida como "densidad óptica" (Optical density" o "OD", en inglés), un término encontrado en la literatura antigua y no se usa comúnmente en la actualidad.

La *Transmitancia* mide la cantidad de luz que pasa a través de una solución. La transmitancia es generalmente expresada como porcentaje, ó %T. La escala de %T es lineal, como aparece en la escala de lectura del colorímetro.

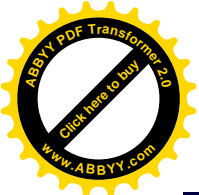
Como es discutido en el Capítulo 4, la absorbancia y el porcentaje de transmitancia están relacionados en forma logarítmica, ya que la absorbancia es una función logarítmica. La interconversión de la absorbancia y el por ciento de transmitancia es comúnmente expresada por la siguiente fórmula:

$$A = -\log \frac{\%T}{100} \times C_s \quad \text{Ec. 1-4}$$

Esta ecuación puede ser convertida algebraicamente como sigue:

$$\begin{aligned} A &= -(\log \%T - \log 100) \\ A &= -(\log \%T - 2) \\ A &= -\log \%T + 2 \\ A &= 2 - \log \%T \end{aligned} \quad \text{Ec. 1-5}$$

El valor de la absorbancia puede ser obtenido con una calculadora usando esta fórmula al presionar las teclas de los números para el % de transmitancia y convirtiéndolos a la forma logarítmica, poniendo un signo de menos y sumando 2.



Ejemplos. Determinación de las concentraciones usando lecturas de absorbancia (A, u OD).

- a. Si la absorbancia de una muestra desconocida es 0.25 y la concentración del estándar es 4 mg/L con una absorbancia de 0.40, la concentración desconocida puede ser calculada usando:

$$C_u = \frac{A_u}{A_s} \times C_s$$

$$C_u = \frac{0.25}{0.40} \times C_s$$
$$C_u = 2.5 \text{ mg/L}$$

- b. Calcular la concentración de glucosa si la siguiente información es conocida:

$$C_s = 2000 \text{ mg/L}, A_s = 0.40, A_u = 0.25$$

Usando la fórmula anterior

$$C_u = \frac{0.25}{0.40} \times 2000 \text{ mg/L}$$
$$C_u = 1250 \text{ mg/L}$$

- c. Calcular la concentración de glucosa de una muestra desconocida (C_u) si el %T es dado. Si el estándar 1000 mg/L de glucosa (C_s) da una lectura de 49% T y la de la muestra desconocida da 55% T, el %T debe ser convertido a absorbancia, ya que solo la absorbancia es directamente proporcional a la concentración:

$$A_s = 2 - \log \%T \quad A_u = 2 - \log \%T$$
$$A_s = 2 - 1.690 \quad A_u = 2 - 1.740$$
$$A_s = 0.31 \quad A_u = 0.26$$
$$49\%T = 0.31A = A_s$$
$$55\%T = 0.26A = A_u$$
$$C_s = 1000 \text{ mg/L}, A_u = 0.26, A_s = 0.31$$

Usando la fórmula como en (a) y (b) de arriba:

$$C_u = \frac{0.26}{0.31} \times 1000 \text{ mg/L} = 839 \text{ mg/L}$$

Coefficiente de extinción molar



Los coeficientes de extinción molar se usan en el laboratorio clínico para calcular concentraciones y actividades enzimáticas en unidades internacionales (U) y para determinar la pureza de las sustancias disueltas. Sus aplicaciones específicas son la verificación de soluciones estándar, tales como hemoglobina o bilirrubina. El coeficiente de extinción molar, o coeficiente de absorbancia molar, ϵ , es definido como la absorbancia de una solución 1M a una longitud de onda dada, en una celda de 1 cm a 25° C. Está relacionada con la absorbancia por la siguiente fórmula:

$$A = \epsilon cl$$

Ec. 1-6

donde A = absorbancia a una longitud de onda específica, c = concentración de la sustancia que está siendo cuantificada, en moles/L, y l es la longitud del paso de luz en cm.

Un estándar apropiado de bilirrubina, como una solución 1 M en cloroformo, tendría una absorbancia teórica de 60,700 (media) \pm 800 litros . moles⁻¹.cm⁻¹ a 453 nm, medida en una celda de 1 cm a 25° C. El razonamiento lógico sugiere que si este estándar fue diluido 1: 60,700 dará una absorbancia de 1.

Ejemplo. Un estándar de bilirrubina 1 M es diluido 1: 60,700 y luego 1: 2, siendo la dilución final de 1: 121,400. La lectura de absorbancia de esta dilución es de 0.495 en una celda de 1 cm. ¿Cual es el coeficiente de extinción del estándar de bilirrubina?

$$\begin{aligned}\epsilon &= \frac{0.495 (121,400)}{1 \text{ mol/L (1 cm)}} \\ \epsilon &= 60,093 \text{ litros . mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}\end{aligned}$$

Una aplicación importante de ϵ , es en la medición de la concentración de sustancias. Si la ϵ de una sustancia es conocida y es usada una celda de 1 cm, la fórmula de la ley de Beer se simplifica como sigue:

$$c = \frac{A}{\epsilon}$$

Ejemplo. La ϵ de NADH a 340 nm es 6.22×10^3 litros . mol⁻¹.cm⁻¹. ¿ Si la absorbancia de NADH a 340 nm es de 0.350, cuál es la concentración?

$$\begin{aligned}c &= \frac{0.350}{6.22 \times 10^3 \text{ L. mol}^{-1}} \\ c &= 5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}\end{aligned}$$

Ejercicios



13. El NADH tiene una absorción molar de 3.3×10^3 a una longitud de onda de 366 nm. Calcular la concentración de una solución que tiene una A (absorbancia) de 0.175 a 366 nm.
14. Un químico está verificando un estándar de bilirrubina. ¿Cuál será la absorción molar de una solución 1 M diluida 1:60,700 y tiene una lectura de 0.70 en una celda de 7 mm?
15. El químico tiene una solución de NADH con una concentración de 0.05×10^{-3} mol/L. Calcular la absorción molar si da una lectura de 0.300 a 334 nm.

Amortiguadores

Los amortiguadores resisten cambios de acidez mediante la formación de un ácido o base débil ionizado con los iones H^+ o OH^- añadidos. Por ejemplo, cuando se añade HCl a una solución de Na^+Ac^- (acetato de sodio) más H^+Ac^- (ácido acético), el H^+ del HCl reaccionará con Ac^- formando más HAc , el cual está levemente ionizado. El ácido acético-acetato amortigua efectivamente, removiendo H^+ de la solución.

La ecuación de Henderson-Hasselbalch se usa para expresar relaciones ácido-base. Existen varias formas de esta ecuación que no serán delineadas aquí, pero que pueden ser usadas para calcular problemas ácido-base. La ecuación más simple es la siguiente:

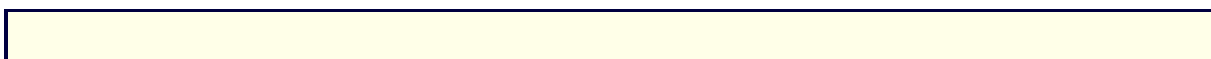
$$pH = pK + \log \frac{\text{Concentración de la base conjugada}}{\text{Concentración del ácido débil}} \quad \text{Ec. 1-7}$$

El valor de pK depende de un grupo específico de condiciones; éstas son grado de disociación, temperatura, y pH. El pK para el sistema amortiguador del bicarbonato en suero o plasma es 6.10 a 37°C. Los libros de referencia química, tales como el Manual de Física y Química, de Lide [Lide Dr, editor: Handbook of Chemistry and Physics, Cleveland, Ohio, CRC Press, yearly updated editions] contienen valores de pK. Como químicos competentes debemos comprender los cálculos básicos de las ecuaciones Henderson-Hasselbalch, aún cuando los instrumentos del laboratorio provean lecturas directas de los valores para las pruebas ácido-base de los pacientes.

Ejemplos

- a. Calcular el pH de un amortiguador de acetato compuesto de acetato de sodio 0.20 M y ácido acético 0.05 M. (El pK del ácido acético es 4.76.)

$$\begin{aligned} pH &= pK + \log \frac{[Sal]}{[ácido]} \\ &= 4.76 + \log \frac{0.20}{0.05} \end{aligned}$$



$$\begin{aligned} & 0.005 \\ & = 4.76 = \log 4 \\ & = 5.3621 \\ \text{pH} & = 5.36 \end{aligned}$$

b. Ahora para un ejemplo complicado. Preparar un litro de amortiguador de acetato cuya concentración de acetato es 0.2 M y tiene un pH de 5.0. (El pK del ácido acético es 4.76; el peso molecular del ácido acético es 60, y 82 para el acetato de sodio.)

$$\text{pH} = \text{pK} + \log \frac{[\text{Sal}]}{[\text{ácido}]}$$

$$\log \frac{[\text{Sal}]}{[\text{ácido}]} = 5.0 - 4.76$$

$$\begin{aligned} [\text{Sal}]/[\text{Ácido}] &= \text{antilog } 0.24 \\ [\text{Sal}]/[\text{Ácido}] &= 1.7 \end{aligned}$$

El número 1.7 es la relación entre las moles por litro de la sal y los moles por litro del ácido. Cualquier concentración molar de sal y ácido que dan una razón de 1.7 resultará en un amortiguador de acetato con pH de 5.0.

Nota. El problema especifica una concentración de la solución, 0.2 M, o $\text{HAc} + \text{Ac}^- = 0.2 \text{ M}$. Si

$$\text{Ac}^-/\text{HAc} = 1.7$$

entonces

$$\text{Ac}^- = 1.7 \text{ HAc}$$

o

$$\text{HAc} + 1.7 \text{ HAc} = 0.2 \text{ M}$$

y

$$\begin{aligned} 2.7 \text{ HAc} &= 0.2 \\ \text{HAc} &= 0.074 \text{ mol/L de ácido} \\ \text{PM} \times \text{M} &= \text{g/L} \\ 60 \times 0.074 &= 4.44 \text{ g/L de ácido necesario} \end{aligned}$$

Para calcular el peso de sal necesario, para 1L use:

$$\begin{aligned} \text{Moles de Sal} &= \text{Moles totales} - \text{Moles de ácido} \\ &= 0.2 - 0.074 \\ &= 0.126 \text{ moles de Sal} \end{aligned}$$

Como fue hecho para el ácido:

$$\text{PM de sal} \times \text{M} = \text{Gramos de sal/litro}$$



$$82\text{g/mol} \times 0.126\text{ mol/L} = 10.33\text{ g de sal/L}$$

Cuando están disueltos 4.44 g de ácido y 10.33 de sal en un volumen total de 1L, la concentración resultante del amortiguador es 0.2 M a un pH de 5.0.

Cálculos enzimáticos

La expresión de actividad enzimática en unidades internacionales ha sido generalmente aceptada desde su recomendación por la Unión Internacional de Bioquímica ("International Union of Biochemistry" o "UIB", en inglés), a principios de los 1960s. Una unidad internacional, U, de enzima es definida como la cantidad que catalizará la transformación de 1 μmol de sustrato por minuto bajo condiciones estándar. La actividad es expresada en términos de unidades de enzima por litro de suero, o miliunidades por mililitros de suero, en la siguiente relación:

$$1\text{ U/L} = \text{mmol/minuto/litro de suero}$$

La explicación de la ecuación básica para la conversión de absorbancia a unidades internacionales, no se intentará en esta parte de cálculos en el laboratorio. Es suficiente decir que deben tomarse en cuenta cualquier cambio como temperatura o volumen para la siguiente ecuación básica (ver Capítulo 54):

$$\text{U/L} = \frac{\Delta A/\text{min} \times V_t \times 10^6 (\mu\text{mol/mol})}{\epsilon \times V_s \times l} \quad \text{Ec. 1-8}$$

$\Delta A/\text{min}$ = Cambio de absorbancia por minuto

V_t = Volumen total de la reacción incluyendo muestra, reactivo, y diluyente

V_s = Volumen del suero

l = Longitud de la trayectoria de la celda

ϵ = Coeficiente de extinción

El factor 10^6 mmol/mol se añade para convertir la respuesta a mmol/min/L (U/L).

Ejemplo. ¿Cuál es la actividad de la lactato deshidrogenasa (LD) de 0.1 ml de suero + 3 mL de sustrato, si el NADH formado mostró 0.002 $\Delta A/\text{min}$ a 340 nm? ϵ para NADH = $6.22 \times 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Usando la fórmula de arriba:

$$\text{U/L} = \frac{0.002 (10^6 \mu\text{mol/mol}) (3.1\text{ mL})}{1\text{ min} (6.22 \times 10^3 \text{ L/mol} \cdot \text{cm})(0.1\text{ mL})(1\text{ cm})}$$
$$\text{U/L} = 9.9$$

Ejemplo. El cálculo de las unidades internacionales por litro de la actividad de fosfatasa alcalina usando un estándar de *p*-nitrofenol requiere atención de todos los factores de la



formula:

$$U/L = \frac{\Delta A / \text{min} \times V_t \times 10^6 (\mu\text{mol/mol})}{\epsilon \times V_s \times l}$$

Si ΔA de la muestra = 0.070, el ϵ para *p*-nitrofenol es 50,000 L/mol · cm; tiempo = 15 min; V_t = 5.5 mL; V_s = 0.005 mL.

$$U/L = \frac{(10^6 \mu\text{mol/mol}) (5.5 \text{ mL})}{15 \text{ min.} (50,000 \text{ mol} \cdot \text{cm}) (0.005 \text{ mL}) (1 \text{ cm})}$$

$$UL = \frac{0.070 \times 5.5 \times 1000}{50 \times 0.075}$$

103 U/L = Actividad de la fosfatasa alcalina

Curvas estándar

La preparación de curvas estándar en gráficas de papel es un camino esencial para examinar la validez de los datos. Frecuentemente las calculadoras o computadoras no revelan anomalías en el sistema pero calculan resultados sacando un promedio. Por lo tanto la construcción de la gráfica de los datos es un camino importante para validar un ensayo.

Previamente, en este capítulo, se definió la ley de Beer como la relación directa de absorbancia y concentración en una solución. Esto significa que si una solución al 2% da una lectura de 0.1 A, entonces a 4% de concentración dará una lectura de 0.2 A, y una solución de 8% dará una lectura de 0.4 A. Repitiendo, la mayoría de las soluciones obedecen la ley de Beer; que es, concentración y absorbancia son directamente proporcionales sólo sobre un intervalo específico de concentración.

Gráficas

Fig. 1-15.

Las absorbancias de las concentraciones del estándar de glucosa trazadas en papel milimétrico resultan en una línea recta, confirmando que la ley de Beer se cumple hasta la concentración de 3000 mg/L.

Fig. 1-16. El trazo de los valores de %T de las mismas concentraciones de glucosa usada en la Fig. 1-15 en papel lineal produce una línea semicurva; los valores de %T *no* son lineales contra las concentraciones. (Recordar la relación logarítmica de absorbancia y %T.)

Fig 1-17. El trazo de los valores de %T en papel semilogarítmico resulta una línea recta, la cual puede ser usada para interpolar las concentraciones de glucosa usando los valores de %T



Ejercicios (Figs. 1-15 and 1-17)

Encontrar las concentraciones de glucosa para las siguientes lecturas usando las Figs. 1-15 y 1-17.

- 16. 0.3 A = ____ mg/L
- 17. 0.39 A = ____ mg/L
- 18. 49% T = ____ mg/L
- 19. 52% T = ____ mg/L

Ejercicios usando un estándar de valor conocido para determinar concentraciones desconocidas

¿Cuáles son las concentraciones de glucosa de las siguientes muestras de pacientes si el estándar de 2000 mg/L da una lectura de 0.32 A?

Podemos emplear ya sea:

$$Cu = \frac{Au}{As} \times Cs$$

o

$$\frac{Cu}{Cs} = \frac{Au}{As}$$

- 20. 0.22 A = ____ mg/L
- 21. 0.14 A = ____ mg/L
- 22. 0.46 A = ____ mg/L

Cálculos para la prueba de depuración renal

Las pruebas de depuración renal son usadas para evaluar la función de los riñones. La Depuración renal es una medida del índice que expresa el volumen de sangre depurada de la sustancia que está siendo estudiada (típicamente, creatinina o urea) por unidad de tiempo. Por lo tanto la unidad para la prueba de depuración renal son mililitros por minuto.

Para calcular la depuración de creatinina, se requiere de la siguiente información:

Concentración sérica suero [S]

Concentración urinaria [U] (*Precaución:* las concentraciones de suero y orina deben estar en las mismas unidades, e.g., mg/L o mg/dL.)

Volumen de orina excretado por minuto (V) (Volumen de orina colectado dividido entre el período de tiempo en minutos.)

$$U \times V$$



$$\text{Depuración} = \frac{\text{---}}{S}$$

Los cálculos anteriores no toman en cuenta el área de superficie corporal del paciente. Si el médico requiere el valor corregido, la ecuación debe ser multiplicada por $1.73/A$, donde 1.73 es igual al promedio del área de superficie corporal en metros cuadrados y A es igual al área de superficie corporal del paciente.

$$\text{Depuración (corregida)} = \frac{U \times V}{S} \times \frac{1.73}{A}$$

El área de superficie corporal del paciente está computada en un nomograma, usando su estatura y peso, o se puede calcular usando la siguiente fórmula:

$$\log A = (0.425 \times \log P) + (0.725 \times \log H) - 2.144$$

donde A es el área de superficie corporal en metros cuadrados; P es el peso del paciente en kilogramos; y H es la estatura del paciente en centímetros.

Ejemplos

- a. Determine la depuración de creatinina no corregida para un paciente con una creatinina en suero de 25 mg/L. La creatinina en orina fue 500 mg/L y el volumen de orina volumen fue 312 mL/4 hr.

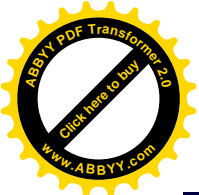
$$312 \text{ mL}/240 \text{ min} = 1.3 \text{ mL/min}$$

$$C = \frac{U}{S} \times V = \frac{500}{2.5} \times 1.3 = 26 \text{ mL/min}$$

- b. Calcule la depuración de creatinina corregida para un niño que pesó 22.7 kg, tuvo 95 cm de estatura y se le colectó un volumen de 500 mL de orina durante un período de 24 horas. Los valores de creatinina en suero y orina fueron 0.14 mmol/L y 4.75 mmol/L respectivamente.

$$\begin{aligned} \log A &= (0.425 \times \log 22.7) \\ &+ (0.725 \times \log 95) \\ &- 2.144 \\ \log A &= 0.576 + 1.434 - 2.144 = 0.134 \\ A &= 0.734 \\ 500 \text{ mL}/1440 \text{ min} &= 0.35 \text{ mL/min} \end{aligned}$$

$$U \quad 1.73$$



$$\begin{aligned} C &= \frac{\text{---}}{X} \times V \times \frac{\text{---}}{A} \\ &= \frac{4.75}{0.14} \times V \times 0.35 \times \frac{1.73}{0.734} \\ &= 2.80 \text{ mL/min} \end{aligned}$$

Pruebas urinarias usando el factor tiempo

Los resultados de la pruebas de orina pueden ser reportados en muchas maneras. Los valores pueden ser reportados como unidades de concentración, cantidad por volumen total, y cantidad por unidad de tiempo. La utilidad clínica de las pruebas de orina es incrementada cuando los resultados cuantitativos están expresados como cantidad por volumen total o cantidad excretada en un período de tiempo dado. Las buenas prácticas de laboratorio dictan que el volumen total de orina y el tiempo de inicio y terminación del período de colecta deben ser anotados.

Cuando los resultados de la prueba de orina se reportan como cantidad por volumen total, la concentración es medida y los resultados son corregidos como sigue:

$$\frac{\text{Cantidad}}{\text{Volumen total}} = \text{Concentración medida} \times \text{Volumen total}$$

Estos cálculos requieren que ambos; el volumen de orina y la concentración dada por el instrumento de medición sean reportados usando las mismas unidades.

Ejemplos

- a. Calcule la cantidad de proteína en 2400 mL de orina con una concentración de 30 mg/dL.

$$\frac{\text{Cantidad}}{\text{Volumen total}} = \frac{30 \text{ mg}}{100 \text{ mL}} \times 2400 \text{ mL} = 720 \text{ mg}$$

- b. Determine la cantidad de sodio en 1800 mL de orina con una concentración de sodio de 35 mEq/L.

$$\frac{\text{Cantidad}}{\text{Volumen total}} = \frac{35 \text{ mEq}}{1000 \text{ mL}} \times 1800 \text{ mL} = 63 \text{ mEq}$$

Cuando los resultados son reportados como cantidad por período de tiempo de colecta, los cálculos de la cantidad de sustancia por volumen total deben ser realizados primero y el resultado, reportado por duración de tiempo, en lugar de volumen total.



Ejercicios adicionales

23. La solución estándar de hemoglobina contiene 200 g/L. ¿Que cantidades se usarían para preparar 6 mL de las siguientes concentraciones?

200 g/L 150 g/L 100 g/L 50 g/L

24. a. ¿Qué fracción de la urea es nitrógeno? La formula condensada de la urea es $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$.

Pesos atómicos:

C = 12

O = 16

N = 14

H = 1

- b. ¿Que porcentaje de urea es nitrógeno?

25. Hay en existencia HCl concentrado, teniendo un 38% de análisis y una gravedad específica de 1.170.

a. Cual es el peso del HCl presente en 1 mL?

b. Para la preparación de 100 mL de HCl 10% peso/vol, ___ mL de HCl serán diluidos al volumen total de mL.

26. Una solución salina normal tiene una concentración de 0.85%. ¿Cual es su molaridad? (El peso molecular del NaCl es 58.5)

27. Si el estándar de proteína da una lectura de 0.48 A, y la muestra de un paciente da una lectura 0.36 A, cual es la concentración de las proteínas del paciente? Seleccione una de las siguientes respuestas:

- a. Dos veces la concentración del estándar
- b. Igual a la concentración del estándar
- c. Tres cuartos de la concentración del estándar.
- d. No son suficientes los datos para hacer los cálculos

28. Un paciente en coma diabético tiene niveles altos de glucosa, así que su suero es diluido 1: 2 y otra vez 1:2 para poder leerlo en la gráfica de glucosa como 1900 mg/L. ¿Cual es la concentración real en (a) mg/L; (b) mg/dL, y (c) g/L?

29. ¿Cuántos mEq/L hay en una solución conteniendo 27.7 mg/dL de potasio? (Peso atómico del K = 39.)

30. ¿Cuántos mL de NaOH 0.4 N pueden hacerse de 20 mL de una solución 2 N ?

31. ¿Cuál es la normalidad de una solución conteniendo 40 mEq de NaOH en 50 mL?

32. Cual es la dilución de suero en un tubo conteniendo 200 mL de suero, 500 mL de salina, y 300 mL de reactivo?

33. Calcule la actividad de la fosfatasa alcalina en U/L para lo siguiente:



ϵ del estándar (*p*-nitrofenol) = $5 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$

$\Delta A_{\text{muestra}} = 150$

$V_{\text{muestra}} = 0.2 \text{ mL}$

$V_{\text{total}} = 2.2 \text{ mL}$

Tiempo = 15 minutos

34. Cual es el coeficiente de extinción de lo siguiente:

Concentración de la solución = 1.2 molar

Dilución de la solución = 1/121,400

Una lectura en la celda de 1cm = 0.6

35. Se necesita preparar una solución 0.01 M de Na_2HPO_4 : (PM de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 = 141.98$). Solo está disponible la sal hidratada, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ (PM = 267.98). ? Cuántos gramos serán necesarios para preparar 250 mL?
36. Si una solución de 50 mg/mL de Na_2HPO_4 necesita ser preparada, ? cuántos gramos de la sal hidratada mencionada arriba se necesitan pesar para hacer 1 L de solución ?
37. Un químico desea preparar 50 mL de una solución de 10 mg/mL de NADH (PM= 663.44). Para hacer esto exactamente, el químico preparará primero una solución concentrada conteniendo aproximadamente 50 mg/mL. La absorbancia de la dilución 1: 1000 de la solución concentrada se medirá a 340 nm y de la absorbancia molar conocida de NADH a esta longitud de onda (6.22×10^3), será calculada la concentración real. Entonces se hará una dilución conveniente para obtener 500 mL de la solución deseada de 10 mg/mL. Asumiendo que estas instrucciones fueron seguidas, la dilución de la solución concentrada preparada, tendrá una absorbancia de 0.562. Calcule concentración de NADH en esta solución concentrada en mmol/L y mg/L. ? Qué dilución debe hacerse para preparar la solución de 10 mg/ mL de NADH ?
38. El nivel de calcio en el suero de un paciente es 3.5 mEq/L. El valor normal esperado es de 90 a 110 mg/L. ? El nivel de calcio del paciente es más bajo, dentro o más alto que el valor normal esperado?
39. Una concentración de sodio es reportada como 3500 mg/L. Cual es la concentración en mEq/L? (peso atómico del sodio = peso equivalente = 23 g/mol o 23 mg/mmol)
40. Si el estándar de cianometahemoglobina, con una concentración de 200 g/L, da una lectura de 0.426 A, y una muestra de sangre del paciente da una lectura de 0.297 A, ? cual es la concentración de hemoglobina en la muestra?
41. Un estándar de nitrógeno de urea de 200 mg/L da una lectura de 0.30 A y la muestra de un paciente da una lectura de 0.40 A. La concentración del estándar comparada con el nivel del paciente es:
- Más alto
 - Dos veces más
 - 3/4 más
 - 4/3 más
42. Un estándar de glucosa de 2000 mg/L da una lectura de 0.4 A y la muestra del paciente



da una lectura de 1.0 A. El químico debe:

- a. Reportar el resultado como 500 mg/dL.
- b. Repetir la prueba antes de reportar.
- c. Repetir la prueba en una muestra diluida.
- d. Preparar un nuevo estándar de glucosa.

Apéndice: Repuestas a los Problemas

1. 0.5 M
2. 0.4 M
3. 50 mg/L
4. 1:320
5. 1:128
6. 7.68 mL
7. 6
8. 0.667
9. 4
10. 12.5
11. 7.82
12. 36.05
13. $c = 53 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$
14. $\epsilon = 60,700 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
15. $6.0 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
16. 1900 mg/L
17. 2400 mg/L
18. 1920 mg/L
19. 1740 mg/L
20. 1375 mg/L
21. 875 mg/L
22. 2870 mg/L
23. 200 g/L = 6 mL + 0 mL de diluyente
150 g/L = 4.5 mL + 1.5 mL de diluyente
100 g/L = 3.0 mL + 3 mL de diluyente
50 g/L = 1.5 mL + 4.5 mL de diluyente
24. a. $28/60 = 7/15$
b. 46.6 %
25. a. 0.445 g
b. 22.5 mL será diluido a 100 mL
26. 0.145 mol/L
27. c
28. a. 7600 mg/L
b. 760 mg/dL
c. 7.6 g/L



29. 7.1 mEq/L
30. 100 mL
31. 0.8 N
32. 1:5
33. 2.2 U/L
34. 6.07×10^4
35. 0.67 g
36. 94.4 g
37. La concentración de NADH en la solución concentrada es 90.4 mmol/L o 60 mg/mL. Tomar 8.3 mL de la solución concentrada y diluir a 50 mL para preparar la solución de 10 mg/mL.
38. 70 mg/L: más bajo que el intervalo esperado
39. 152 mEq/L
40. 139 g/L
41. c. 3/4 como máximo
42. c

Referencias

1. *Preparation and Testing of Reagent Water in the Clinical Laboratory*, ed 2, NCCLS Approved Guideline C3-A2 Villanova, PA, 1991, National Committee for Clinical Laboratory Standards.
2. Gabler, R, Hegde, R, and Hughes, D: Degradation of high purity water on storage, *J Liquid Chromatog* 6:2565-2570, 1983.
3. Winstead, M: *Reagent grade water: How, when and why?* American Society of Medical Technologists, Austin, Texas, 1967. Steck Co.
4. Jorgenson, JH, Smith, RF: Rapid detection of contaminated intravenous fluids using the Limulus in vitro endotoxin assay, *Appl Microbiol* 26:521-524, 1973.
5. Sullivan, JD Jr, Valoes, FW, Watson, SW: Endotoxins: the Limulus amoebocyte lysate system. In *Mechanisms in bacterial toxicology*, AW Bernheimer (ed) New York, 1976, John Wiley & Sons, Inc, p. 217.
6. Bristol, DW: Detection of trace organic impurities in binary solvent systems. A solvent purity test, *J Chromatog* 188:193, 1980.
7. *Clinical Laboratory Technical Procedure Manuals - Second Edition*. NCCLS Approved Standard GP2-A2 Villanova, PA 1992. National Committee for Clinical Laboratory Standards.
8. Statement from Quadrennial Symposium on Measurable Properties (Quantities) and Units in Clinical Chemistry, Gaithersburg, MD. August 5 and 6, 1976. *Am J Clin Pathol* 71:465-468, 1979.
9. *Clinical Chemistry: Theory, analysis, and correlation*. ed 2, Kaplan, LA and Pesce, AJ, St. Louis, MO, 1989, Mosby.
10. *Determining Performance of Volumetric Equipment*, NCCLS Proposed Standard I8-P, Villanova, PA, 1984, National Committee for Clinical Laboratory Standards.
11. Lide DR: *Handbook of Chemistry and Physics*, ed 76, Boca Raton, Fla., 1995, CRC Press.
12. Lashor TW, Macurdy, LB: *Precision laboratory standards of mass and laboratory weights*. National Bureau of Standards Circular 547, Washington, DC, 1954. United States Department of Commerce.
13. McCoubrey, AO: *Guide for the use of the international system of units: the modernized metric system*. National Institute of Standards and Technology Spec Publ 811, Washington, DC, 1991, United States Department of Commerce.

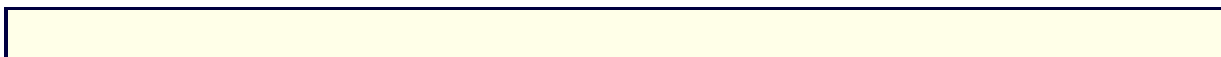


14. The National Committee for Clinical Laboratory Standards Position Paper (PPC-11): *quantities and units* (SI), *Clin Chem* 25:657-658, 1979.
15. Committee on Hospital Care, American Academy of Pediatrics: Metrication and SI units. *Pediatrics* 65:659-664, 1980.
16. *Laboratory Instrument Maintenance Manual*, Skokie, IL, 1989, p 99, College of American Pathologists.
17. *Temperature calibration of water baths, instruments, and temperature sensors*, ed 2, NCCLS Approved Standard I2 - A2, Villanova, PA, 1990. National Committee for Clinical Laboratory Standards.
18. *Procedures for the handling and processing of blood specimens*, NCCLS Approved Guideline H18-A, Villanova, PA, 1990, National Committee for Clinical Laboratory Standards.
19. *Laboratory instrument evaluation and verification manual*, College of American Pathologists, Skokie, Ill., 1989, p111.
20. *A centrifuge primer*, Palo Alto CA, 1980, Spinco Div. Beckman Instruments, Inc.
21. Occupational Safety and Health Administration (Department of Labor): Occupational exposures to hazardous chemicals in laboratories: final rule, *Federal Register*, 29 CFR Part 1910.1450, 55(21): 300-3335, Jan 31, 1990.
22. Occupational Safety and Health Administration (Department of Labor) Occupational exposure to bloodborne pathogens: final rule, *Federal Register*, 29 CFR Part 1910.1030, (235):64003-64182, Dec 6, 1991.
23. *Sigma-Aldrich Library of Chemical Safety Data*, Sigma Chemical Co, St. Louis, MO (available in written or CD-ROM formats).
24. Compressed Gas Association, Inc: *Handbook of compressed gases*, ed 2, New York, 1981, Reinhold Publishing Corp.
25. Lan G, Sansone EB: *Destruction of hazardous chemicals in the laboratory*, New York, 1990, John Wiley & Sons.
26. United States Department of Health and Human Services: Recommendations for prevention of HIV transmission in health care setting, *Morbidity, Mortality Weekly Report* 56(25), Aug 21, 1987.
27. Rutale WA, Weber DJ: Infectious waste-mismatch between science and policy: soundboard, *N Engl J Med* 325:578-581, 1991.

Tablas

Tabla 1-1. Comparación de los procesos de purificación del agua.^{ref(40)}

Proceso de purificación:	
Destilación	
Clases mayores de contaminantes:	
Sólidos ionizado disueltos:	
E/G ^{ref(41)}	
Gases ionizados disueltos:	
P	
Orgánicos disueltos ^{ref(42)} :	
G	
Partículas:	
E	
Bacterias ^{ref(43)} :	
E	
Pirógenos/endotoxinas:	



E	
	Proceso de purificación: Desionización
	Clases mayores de contaminantes:
	Sólidos ionizado disueltos:
E	
	Gases ionizados disueltos:
E	
	Orgánicos disueltos^{ref(44)}:
P	
	Partículas:
P	
	Bacterias^{ref(45)}:
P	
	Pirógenos/endotoxinas:
P	
	Proceso de purificación: Osmosis
	inversa
	Clases mayores de contaminantes:
	Sólidos ionizado disueltos:
G ^{ref(46)}	
	Gases ionizados disueltos:
P	
	Orgánicos disueltos^{ref(47)}:
G	
	Partículas:
E	
	Bacterias^{ref(48)}:
E	
	Pirógenos/endotoxinas:
E	
	Proceso de purificación:
	Adsorción por carbón
	Clases mayores de contaminantes:
	Sólidos ionizado disueltos:
P	
	Gases ionizados disueltos:
P ^{ref(49)}	
	Orgánicos disueltos^{ref(50)}:
E/G ^{ref(51)}	
	Partículas:
P	
	Bacterias^{ref(52)}:
P	
	Pirógenos/endotoxinas:
P	
	Proceso de purificación:
	Filtración
	Clases mayores de contaminantes:



	Sólidos ionizado disueltos:	
P		
	Gases ionizados disueltos:	
P		
	Orgánicos disueltos^{ref(53)}:	
P		
	Partículas:	
E		
	Bacterias^{ref(54)}:	
E		
	Pirógenos/endotoxinas:	
P		
Proceso de purificación:		
Ultrafiltración		
Clases mayores de contaminantes:		
	Sólidos ionizado disueltos:	
P		
	Gases ionizados disueltos:	
P		
	Orgánicos disueltos^{ref(55)}:	
G ^{ref(56)}		
	Partículas:	
E		
	Bacterias^{ref(57)}:	
E		
	Pirógenos/endotoxinas:	
E		
Proceso de purificación:		
		U.V.
Oxidación		
Clases mayores de contaminantes:		
	Sólidos ionizado disueltos:	
P		
	Gases ionizados disueltos:	
P		
	Orgánicos disueltos^{ref(58)}:	
E/G ^{ref(59)}		
	Partículas:	
P		
	Bacterias^{ref(60)}:	
G ^{ref(61)}		
	Pirógenos/endotoxinas:	
P		
<i>E</i> ; Excelente (capaz de eliminación total o cercana a la totalidad)		
<i>G</i> ; Buena (capaz de eliminar grandes porcentajes)		
<i>P</i> ; Pobre (poca o ninguna eliminación)		

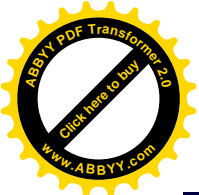


Tabla 1-2. Especificaciones para el agua como reactivo.

	Tipo I	Tipo II	Tipo III
Contenido bacteriano máximo, unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL)	10 ^{ref(62)}	1000	N.S.
pH	N.S.	N.S.	5.0-8.0
Resistividad mínima, megohm-centímetro (megohm-cm 25° C)	10(en línea)	1.0	0.1
Máximo silicato mg/L SiO ₂	0.05	0.1	1.0
Material particulado ^{ref(63)}	0.22µm filtro ^{ref(64)}	N.S.	N.S.
Contaminantes orgánicos ^{ref(65)}	Carbón activado	N.S.	N.S.
N.S., No especificado.			

Tabla 1-3. Usos sugeridos del agua como reactivo.^{Note(66)}

Especial ^{ref(67)}	Tipo I	Tipo II	Tipo III
HPLC	Ensayo de elementos trazas y metales pesados ^{ref(68)}	Preparación de medios bacteriológicos	Lavado cristalería y enjuague preliminar
Cultivo celular/tejido (libre de pirógenos)	Ensayo enzimático Ensayos de ligando Reactivos sin preservativos	Tinciones y colorantes (histología/parasitología)	
Análisis cromosomal	Ensayos inmuno-fluorescentes cuantitativos	Reactivos que serán esterilizados	
IVF/GIFT ^{ref(69)}	Preparación de soluciones estándar	Reactivos con preservativos	
Prueba HLA (con ultrafiltro)	Procedimientos electroforéticos		

Tabla 1-4. Algunos agentes desecantes comunes.



Desecante	Propiedades	Usos
CaCl_2 anhidro	Alta capacidad, acción lenta, En la mayoría de las trabaja bien a menos de 30°C condiciones, muy económico	
MgSO_4 anhidro	Neutro, acción rápida condiciones, es	En la mayoría de las económico
Na_2SO_4 anhidro	Neutro, alta capacidad, trabaja a menos de 32°C , acción lenta	Puede eliminar grandes volúmenes de agua
CaSO_4 anhidro	Extremadamente rápido en acción, químicamente inerte, capacidad límite para absorber agua (6% al 10% de peso en agua)	Mas caro que Na_2SO_4 y MgSO_4 ; vendido comercialmente como Drierite; puede regenerarse fácilmente por calentamiento a $230\text{-}240^\circ \text{C}$ por 3 hrs.
Al_2O_3 (Al activado)	Puede absorber del 15% al 20% de su peso en agua	Puede ser repetidamente reactivado por calentamiento a 175°C por 7 horas

Table 1-5. Tipos de cristalería comúnmente usada y sus propiedades.

Vidrio	Propiedades	Propósito
Kimax/Pírex	Vidrio borosilicato relativamente inerte alta resistencia a los cambios bruscos de frío o calor	Todos propósitos
Vycor	Buena resistencia a condiciones drásticas ignición de calentamiento, shock, tratamiento químico, y alta temperatura; resistencia ácida y alcalina	Cenizas, técnicas de
Corex Usado bajo condiciones	Vidrio de silicato de aluminio, seis veces de tensión	



	más fuerte que el vidrio de borosilicato; resistente a rajaduras y a transferencias alcalinas	
Alto % de Silicato	> 96% silicato; Para trabajo de alta comparable al cuarzo precisión analítica, fundido; tolerancia eléctrica, reflectores óptico química y al calor. Excelentes y espejos propiedades ópticas	
Libre en Boro	Álcali-resistente; Soluciones alta-pobre resistencia; mente alcalinas al calor; suave, < 0.2% boro	
Bajo en actino	El color ámbar o rojo Para uso con reduce la exposición materiales sensibles del contenido a la luz. a la luz en el intervalo x de 300 a 500 nm (e.g. bilirrubina, vitamina A, caroteno)	
Flint artículos	Vidrio Soda-lime conteniendo óxidos de sodio, silicón, y calcio; pobre resistencia a altas temperaturas o cambios de temperatura, poca resistencia química; puede también dejar colar contaminantes orgánicos	Usado para desechables de vidrio, (e.g., pipetas)
Cubierto	Delgado, óxido metálico ligado con fuego a la superficie del vidrio	Conduce electricidad, actúa como barrera electrostática; protege contra rayos infrarrojos
Óptico	Hecho de soda-lime, plomo y borosilicato	Prismas, lentes, y espejos ópticos
Pyroceram	Alta resistencia térmica, químicamente estable, resistente a la corrosión	Placas térmicas, intercambiadores de calor

Tabla 1-6. Resumen de la resistencia química (a 20° C) y propiedades físicas de varios plásticos.*

<u>Resistencia química</u>	
Clases de sustancias:	Ácidos, diluidos o débiles
<u>Tipos de resinas*:</u>	
LDPE:	E
HDPE:	E
PP, PA:	E
PMP:	E
FEP, TFE, ETFE:	E
PC:	E
PSF:	E
Botellas de PVC**:	E
PS:	E
Nylon:	F
Clases de sustancias:	Ácidos, ref(70) fuertes y concentrados
<u>Tipos de resinas*:</u>	
LDPE:	E
HDPE:	E
PP, PA:	E
PMP:	E
FEP, TFE, ETFE:	E
PC:	N
PSF:	G
Botellas de PVC**:	E
PS:	F
Nylon:	N
Clases de sustancias:	Alcoholes, alifáticos
<u>Tipos de resinas*:</u>	
LDPE:	E
HDPE:	E
PP, PA:	E
PMP:	E
FEP, TFE, ETFE:	E
PC:	G
PSF:	G
Botellas de PVC**:	E
PS:	E
Nylon:	G
Clases de sustancias:	Aldehídos
<u>Tipos de resinas*:</u>	
LDPE:	G
HDPE:	G
PP, PA:	G
PMP:	G
FEP, TFE, ETFE:	E
PC:	F



	PSF:	F
	Botellas de PVC**:	N
	PS:	N
	Nylon:	F
Clases de sustancias: Bases		
<u>Tipos de resinas*:</u>		
	LDPE:	E
	HDPE:	E
	PP, PA:	E
	PMP:	E
	FEP, TFE, ETFE:	E
	PC:	N
	PSF:	E
	Botellas de PVC**:	E
	PS:	E
	Nylon:	F
Clases de sustancias: Esteres		
<u>Tipos de resinas*:</u>		
	LDPE:	G
	HDPE:	G
	PP, PA:	G
	PMP:	G
	FEP, TFE, ETFE:	E
	PC:	N
	PSF:	N
	Botellas de PVC**:	N
	PS:	N
	Nylon:	E
Clases de sustancias: Hidrocarburos, alifáticos		
<u>Tipos de resinas*:</u>		
	LDPE:	F
	HDPE:	G
	PP, PA:	G
	PMP:	F
	FEP, TFE, ETFE:	E
	PC:	F
	PSF:	G
	Botellas de PVC**:	E
	PS:	N
	Nylon:	E
Clases de sustancias: Hidrocarburos, aromáticos		
<u>Tipos de resinas*:</u>		
	LDPE:	F
	HDPE:	G
	PP, PA:	F
	PMP:	F
	FEP, TFE, ETFE:	E
	PC:	N
	PSF:	N



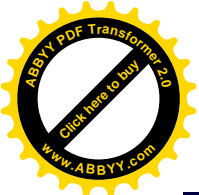
Botellas de PVC**:	N
PS:	N
Nylon:	E
Clases de sustancias:	Hidrocarburos, halogenados
<u>Tipos de resinas*:</u>	
LDPE:	N
HDPE:	F
PP, PA:	F
PMP:	N
FEP, TFE, ETFE:	E
PC:	N
PSF:	N
Botellas de PVC**:	N
PS:	N
Nylon:	G
Clases de sustancias:	Cetonas
<u>Tipos de resinas*:</u>	
LDPE:	G
HDPE:	G
PP, PA:	G
PMP:	F
FEP, TFE, ETFE:	E
PC:	N
PSF:	N
Botellas de PVC**:	N
PS:	N
Nylon:	E
Clases de sustancias:	Agentes oxidantes fuertes
<u>Tipos de resinas*:</u>	
LDPE:	F
HDPE:	F
PP, PA:	F
PMP:	F
FEP, TFE, ETFE:	E
PC:	N
PSF:	G
Botellas de PVC**:	G
PS:	N
Nylon:	N
<u>Propiedades Físicas</u>	
Clases de sustancias:	Temperatura máxima utilizable (° C)
<u>Tipos de resinas*:</u>	
LDPE:	80
HDPE:	120
PP, PA:	135 (PP) 130 (PA)
PMP:	175
FEP, TFE, ETFE:	205(FEP)



		150(ETFE)
PC:		135
PSF:		165
Botellas de PVC**:		70 ^{ref(71)}
PS:		--
Nylon:		--
Clases de sustancias:		Temperatura de fragilidad (° C)
<u>Tipos de resinas*:</u>		
LDPE:		-100
HDPE:		-100
PP, PA:		0 (PP) -40(PA)
PMP:		20 270(FEP)
FEP, TFE, ETFE:		100(ETFE)
PC:		-135
PSF:		-100
Botellas de PVC**:		-30
PS:		--
Nylon:		--
Clases de sustancias:		Esterilización ^{ref(72)}
Clases de sustancias:		Autoclave
<u>Tipos de resinas*:</u>		
LDPE:		No
HDPE:		No
PP, PA:		Si
PMP:		Si
FEP, TFE, ETFE:		Si
PC:		Si ^{ref(73)}
PSF:		Si
Botellas de PVC**:		No ^{ref(74)}
PS:		--
Nylon:		--
Clases de sustancias:		Gas
<u>Tipos de resinas*:</u>		
LDPE:		Si
HDPE:		Si
PP, PA:		Si
PMP:		Si
FEP, TFE, ETFE:		Si
PC:		Si
PSF:		Si
Botellas de PVC**:		Si
PS:		--
Nylon:		--
Clases de sustancias:		Calor seco
<u>Tipos de resinas*:</u>		
LDPE:		No
HDPE:		No



	<table><tr><td>PP, PA:</td><td>No</td></tr><tr><td>PMP:</td><td>Si;^{ref(75)}</td></tr><tr><td>FEP, TFE, ETFE:</td><td>Si</td></tr><tr><td>PC:</td><td>No</td></tr><tr><td>PSF:</td><td>Si</td></tr><tr><td>Botellas de PVC**:</td><td>No</td></tr><tr><td>PS:</td><td>--</td></tr><tr><td>Nylon:</td><td>--</td></tr></table>	PP, PA:	No	PMP:	Si; ^{ref(75)}	FEP, TFE, ETFE:	Si	PC:	No	PSF:	Si	Botellas de PVC**:	No	PS:	--	Nylon:	--									
PP, PA:	No																									
PMP:	Si; ^{ref(75)}																									
FEP, TFE, ETFE:	Si																									
PC:	No																									
PSF:	Si																									
Botellas de PVC**:	No																									
PS:	--																									
Nylon:	--																									
	<table><tr><td>Clases de sustancias:</td><td>Químico</td></tr><tr><td><u>Tipos de resinas*:</u></td><td></td></tr><tr><td>LDPE:</td><td>Si</td></tr><tr><td>HDPE:</td><td>Si</td></tr><tr><td>PP, PA:</td><td>Si</td></tr><tr><td>PMP:</td><td>Si</td></tr><tr><td>FEP, TFE, ETFE:</td><td>Si</td></tr><tr><td>PC:</td><td>Si</td></tr><tr><td>PSF:</td><td>Si</td></tr><tr><td>Botellas de PVC**:</td><td>Si</td></tr><tr><td>PS:</td><td>--</td></tr><tr><td>Nylon:</td><td>--</td></tr></table>	Clases de sustancias:	Químico	<u>Tipos de resinas*:</u>		LDPE:	Si	HDPE:	Si	PP, PA:	Si	PMP:	Si	FEP, TFE, ETFE:	Si	PC:	Si	PSF:	Si	Botellas de PVC**:	Si	PS:	--	Nylon:	--	
Clases de sustancias:	Químico																									
<u>Tipos de resinas*:</u>																										
LDPE:	Si																									
HDPE:	Si																									
PP, PA:	Si																									
PMP:	Si																									
FEP, TFE, ETFE:	Si																									
PC:	Si																									
PSF:	Si																									
Botellas de PVC**:	Si																									
PS:	--																									
Nylon:	--																									
<p>Modificado de 1983-1984 Nalgene Labware Catalog, Nalge Co., Division of Sybron Corp., Rochester, N.Y.</p> <p>* Códigos de resinas: <i>ETFE</i>, Tefzel ETFE (Etileno-tetrafluoretileno); <i>FEP</i>, Teflon FEP (Etileno propileno-florado); <i>HDPE</i>, Polietileno de alta densidad; <i>LDPE</i>, Polietileno de baja densidad; <i>PA</i>, polialomero; <i>PC</i>, policarbonato; <i>PMP</i>, polimetilpenteno("TPX"); <i>PP</i>, polipropileno; <i>PS</i>, poliestireno; <i>PSF</i>, polisulfona; <i>PVC</i>, cloruro polivinílico; <i>TFE</i>, Teflon TFE (tetrafluoretileno).</p> <p>Clasificación de resistencia química: <i>E</i>, 30 días de constante exposición no causa daño. El plástico puede aún tolerarlo por años. <i>G</i>, Poco o ningún daño después de 30 días de constante exposición al reactivo. <i>F</i>, Algún efecto después de 7 días de constante exposición al reactivo. Dependiendo del plástico, el efecto puede ser cuarteamiento, agrietamiento, pérdida de fuerza, o decoloración. Los solventes pueden causar ablandamiento, hinchazón, y pérdida de permeabilidad con LDPE, HDPE, PP, PA, y PMP. El efecto del solvente en estas cinco resinas normalmente es reversible; la parte regresara a su condición normal después de la evaporación. <i>N</i>, No se recomienda para uso continuo. Puede ocurrir daño inmediato. Dependiendo del plástico, los efectos tendrán un mayor cuarteamiento, agrietamiento, pérdida de fuerza, decoloración, deformación, disolución, o pérdida de permeabilidad.</p> <p>** Para mangueras de cloruro polivinílico, ver el <i>Catalogo vigente de Nalgene</i></p> <p>Interpretación de la resistencia química. Este resumen es solo una guía general. Porque son muchos los factores que afectan la resistencia química de un producto dado, usted debe probar bajo sus propias condiciones. Si existe alguna duda sobre las aplicaciones específicas de los productos Nalgene, por favor contacte Technical Service, Nalgene Labware Department, Nalge Company, 75 Panorama Creek Drive, Rochester, NY 14602 o llame (716) 586-3985. Fax (716) 264-3707.</p>																										



Efectos de las sustancias químicas en plásticos. Las sustancias químicas pueden afectar la fuerza, flexibilidad, apariencia de la superficie, color, dimensiones o peso del material de plástico. Los modos básicos de interacción que causan estos cambios son (1) ataque químico en la cadena del polímero, resultando en la reducción de sus propiedades físicas, incluyendo oxidación; reacción de grupos funcionales en o sobre la cadena; y despolimerización; (2) Cambio físico, incluyendo absorción de solventes, haciendo el material de plástico más suave e hinchado; resultando en penetración del solvente a través del plástico; disolución en un solvente; y (3) agrietamiento por la interacción del agente de estiramiento con que fue moldeado el material. La combinación de reactivos con compuestos de dos o más clases puede causar un efecto químico sinérgico e indeseable. Otros factores que afectan la resistencia incluyen la temperatura, presión, y tensión interno o externo (por ejemplo, centrifugación), el tiempo de exposición, y concentración de la sustancia química. A medida que la temperatura se incrementa, la resistencia al ataque decrece.

PRECAUCIÓN. No almacenar agentes oxidantes fuertes en materiales de plástico excepto los que estén hechos de Teflón. Exposición prolongada causa fragilidad y averías. Aunque el almacenado prolongado no se intente al tiempo del llenado, un recipiente olvidado puede pasarse de tiempo y derramar su contenido. No colocar material de plástico en placas calientes o en la flama.

Tablas 1-7. Exactitud de los matraces volumétricos.

Capacidad (mL)	Límite de error	Porcentaje de error
25	0.03	0.1
50	0.05	0.1
100	0.08	0.08
250	0.11	0.04
500	0.15	0.03
1000	0.30	0.03

Tabla 1-8. Exactitud de las pipetas manuales.

Tipo de pipeta	1.0 mL	5.0 mL	10.0 mL	25.0 mL
NBS estándar	0.01	0.02	0.025	
Clase A volumétrica	0.006	0.01	0.02	0.03
Mohr	0.01	0.02	0.03	0.10
Mohr punta larga	0.02	0.04	0.06	--
Serológica	0.01	0.02	0.03	0.10
Serológica abertura amplia	0.05	0.10	0.10	0.20



Serológica punta larga	0.02	0.04	0.06	--
---------------------------	------	------	------	----

Tabla 1-9. Cantidades básicas y unidades del SI (Système International d'Unités).

Cantidad	Unidad básica	Símbolo
Longitud	Metro	m
Masa	Kilogramo	kg
Tiempo	Segundo	s
Corriente eléctrica	Ampere	A
Temperatura	Kelvin	K
Intensidad luminosa	Candela	cd
Cantidad de sustancia	Mol	mol

Tabla 1-10. Unidades derivadas de SI usadas en medicina.

Cantidad derivada	Unidad derivada	Símbolo
Área	Metro cuadrado	m ²
Volumen	Metro cúbico	m ³
Velocidad	Metro por segundo	m/s o m · s ⁻¹
Concentración de sustancia	Mol por metro cúbico	mol/m ³ o mol · m ⁻³
Presión	Pascal	Pa
Energía de trabajo o cantidad de calor	Joule	J
Temperatura en Celsius	Grados Celsius	°C
Actividad (de un radionucleido)	Becquerel	Bq
Potencia	Watt	W
Carga eléctrica o cantidad	Coulomb	C
Potencial eléctrico	Volt	V
Resistencia		ê
Conductancia	Siemens	S

Tabla1-11. Prefijos SI.

Prefijo* Símbolo	Factor	Símbolo	Prefijo*	Factor
atto da	10-18	a	deka	101



femto	10-15	f	hecto	102	
h					
pico	10-12	p	kilo	103	
k					
nano	10-9	n	mega	106	
M					
micro	10-6	F	giga	109	
G					
mili	10-3	m	tera	1012	
T					
centi	10-2	c	peta	1015	
P					
deci	10-1	d	exa	1018	
E -					
*Se recomienda usar solo un prefijo.					

Tabla 1-12. Caracterización de los tipos de balanzas y su relación con sus intervalos de operación.

Tipo de balanza		Capacidad	Escala de
Reproducibilidad		peso, g	lectura g
Precisión balanzas			
Electrónico	32,000	0.1g	±0.1g
	16,000	0.1g	±0.05g
	6000	0.01g	±0.01g
	2000	0.01g	±0.005g
	1200	0.001g	±0.0001g
	110	0.001g	±0.0005g
Mecánica	20,000	2	±1g
	10,000	1	±0.5g
	5,000	0.1	±0.05g
	2,200	0.01	±0.01g
	160	0.001	±0.001g
Balanzas analíticas			
Electrónicas	210	0.1 mg	±0.1 mg
	205	0.01 mg	±0.03 mg
	50	0.1mg	±0.1mg
	20	2 µg	±3µg
Mecánicas	160	0.1 mg	±0.05 mg
	160	0.01 mg	±0.01 mg
Microbalanzas			



Electrónicas	5.1	1.0 µg	±0.9 µg
	2.1	0.1 µg	±0.25 µg
Mecánicas	20	0.001 mg	±0.001 mg

Tabla 1-13. Tolerancias NIST individuales para pesas de clase S.

Tolerancia individual (mg)	Tolerancia mantenida (mg)	Masa nominal
1, 2, 3, 4, 10, 20, 30, 50 mg	±0.014	±0.014
100, 200, 300, 500 mg	±0.025	±0.05
1, 2, 3, 5, g	±0.054	±0.11
10, 20, 30 g	±0.074	±0.148
50 g	±0.12	±0.22
100 g	±0.25	±0.5

Tabla 1- 14. Clases o tipos de fuegos.

Clase	Riesgo
A	Ropa, madera, papel, combustibles ordinarios
B	Líquidos inflamables (grasas, solventes) Gases inflamables (natural o manufacturado)
C	Equipo de operación eléctrica (Si la electricidad se apaga, el fuego es reclassificado como A o B)

Tabla 1-15. Comparación de tipos de extinguidores de fuego.

Tipo	Ventajas	Desventajas	Notas*
Halon (Clase A,B, C, o B,C)	<ul style="list-style-type: none">• Rápido control del fuego.• Puede alcanzar fuegos ocultos• No daña el equipo.• Buen margen de descarga.• Absorbe el calor.• Recargable	<ul style="list-style-type: none">• Requiere rápida descarga.• Más caro• De riesgo personal (Halom 1211)• No es útil para fuegos intensos• Riesgo ambiental.	<ul style="list-style-type: none">• Sistema más común para fuegos por electricidad• Máxima eficacia requiere rápida detección• Menor impacto ambiental si se recarga en sistema cerrado



Polvo químico (Clases A, B, C)	<ul style="list-style-type: none">• Bueno en grasa y aceite.• Buen control• Bajo costo• Recargable	<ul style="list-style-type: none">• Limitado riesgo para el personal.• Posible daño al equipo.	<ul style="list-style-type: none">• Compatible con otros agentes• Sujeto a interferencia en el equipo• Requiere limpieza• No indicado para fuegos ocultos
Dióxido de carbono (Clase B,C)	<ul style="list-style-type: none">• Buena supresión• Capacidad de enfriamiento.• Alcanzará fuegos escondidos• No daña el equipo.• No causa olores.• Recargable	<ul style="list-style-type: none">• Puede ser tóxico para el personal.• Puede causar daño termostático• Acumulación de vapores pesados limitando el rango de la descarga total	<ul style="list-style-type: none">• Segunda opción después del Halon para fuegos tipo B y C
Polvo químico regular (Clase B,C)	<ul style="list-style-type: none">• No produce calor• Fácil de limpiar• Buen control• Inodoro• No conductivo• Recargable	<ul style="list-style-type: none">• No es recomendable para fuegos ocultos• Leve riesgo respiratorio	<ul style="list-style-type: none">• Segunda opción después del Halom cuando fuegos clase B y C

*Del proveedor de materiales de seguridad para el laboratorio

Figuras

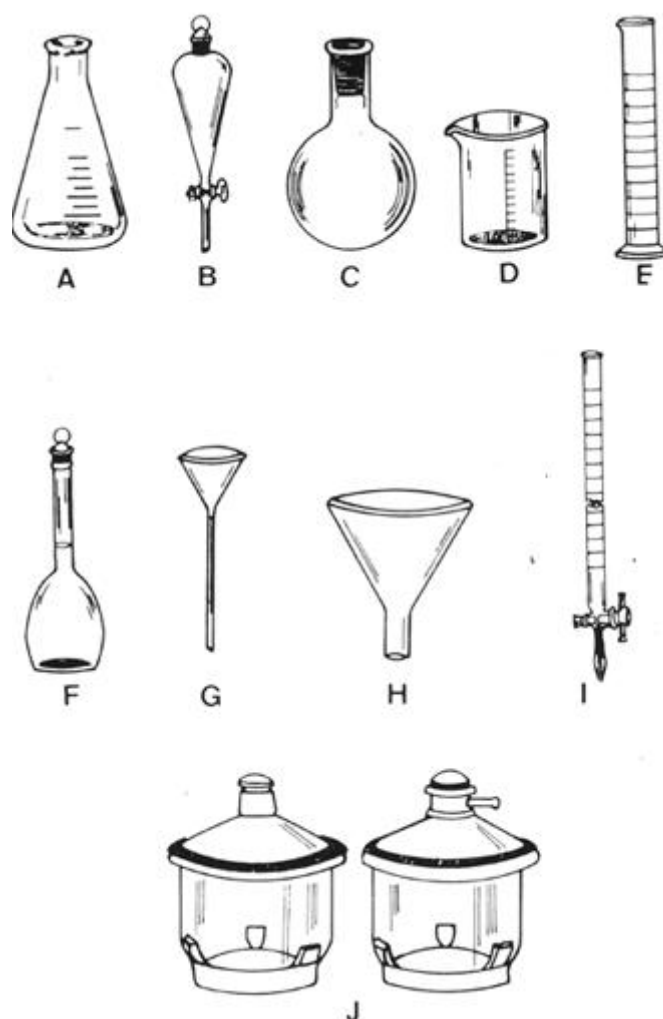


Figura 1-1 Ejemplos de utensilios comúnmente usados en el laboratorio. A, Matraz Erlenmeyer. B, Embudo de separación C, Matraz de fondo redondo. D, Vaso de precipitados. E, Probeta. F, Matraz volumétrico. G, Embudo de tallo largo (para filtrar). H, Embudo de polvos. I, Bureta. J, Desecadores.



Principios básicos de laboratorio y cálculos

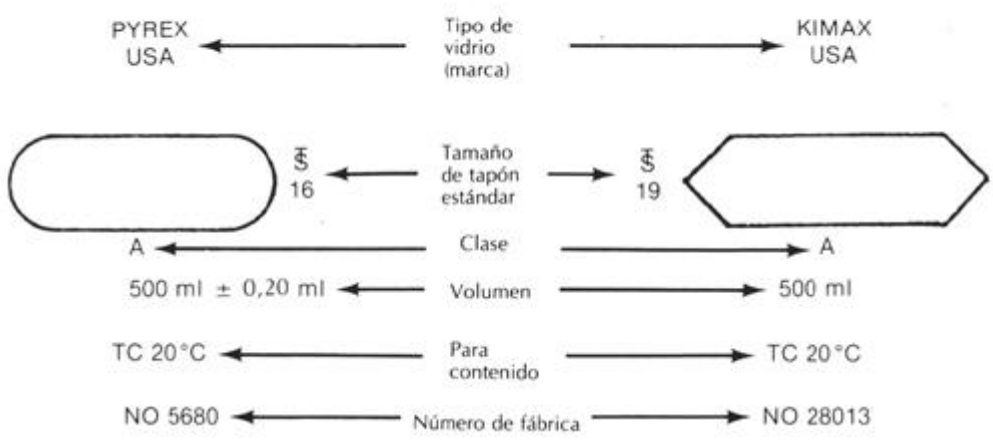


Figura 1-2 Ejemplo de especificaciones NIST que se encuentran grabadas en matraces volumétricos clase A.

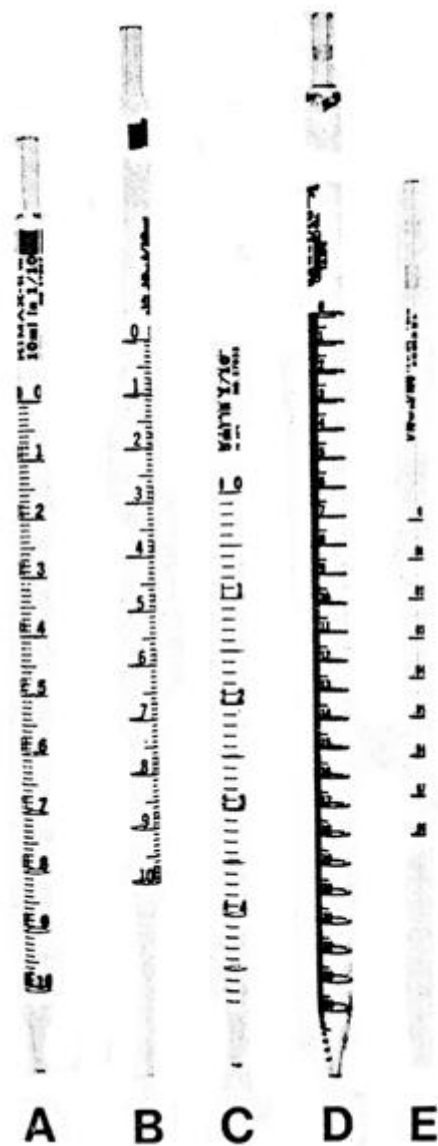


Figura 1-3 Ejemplos de pipetas para transferir (PT). A, Mohr. B, Mohr punta larga. C, Serológicas. D, Serológicas con abertura ancha. E, Serológicas de punta larga.

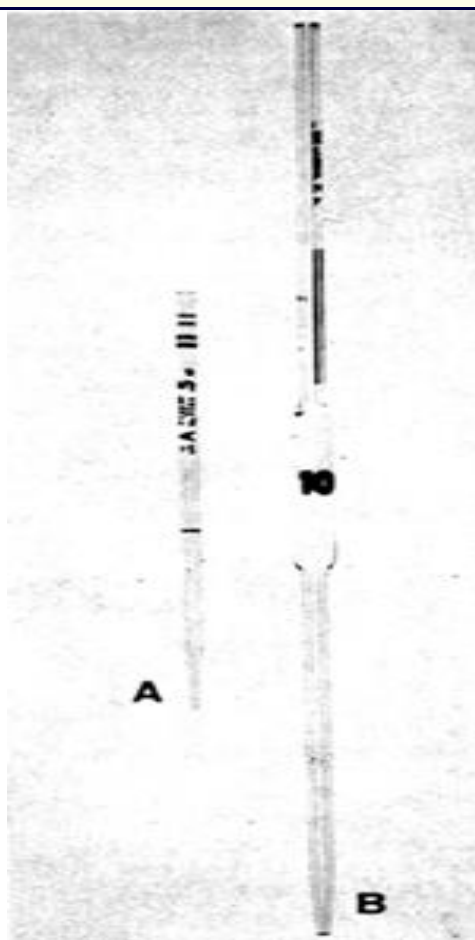


Figura 1-4 Ejemplos de pipetas para transferir (PT). A, Ostwald-Folin. B, Volumétricas clase A.

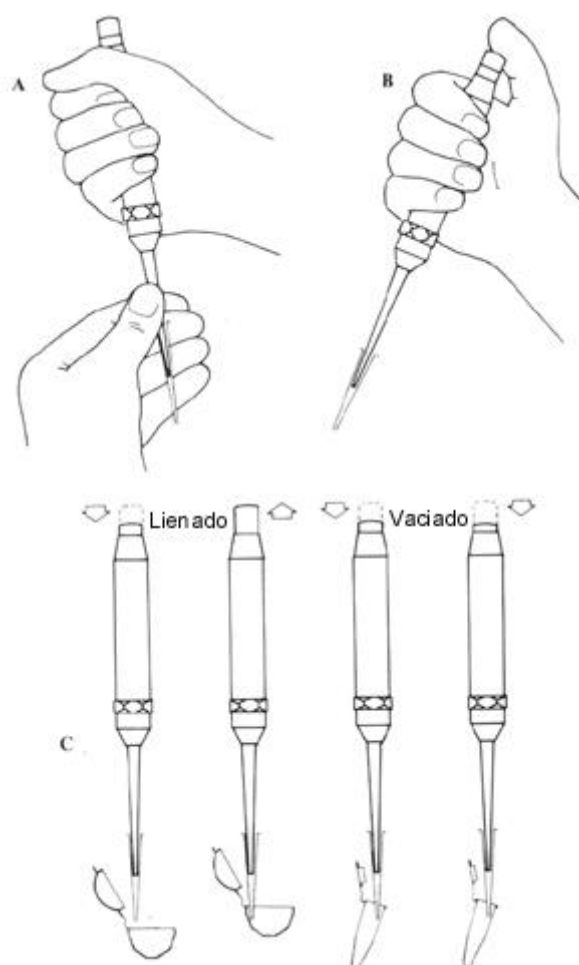


Figura 1-5 Pasos para la utilización de micropipetas tipo Eppendorf. **A**, Anexando el tamaño apropiado de punta para el intervalo de volumen de la pipeta rotar la punta al mismo tiempo que se empuja en la pipeta para lograr un sellado continuo sin filtración de aire. **B**, Posición de la pipeta antes de su uso. **C**, Instrucciones detalladas para llenar y vaciar la punta de la pipeta. Seguir las instrucciones completas del fabricante para el cuidado y uso de micropipetas.



Figura 1-6 Ejemplo de dispensador manual o repipetor.

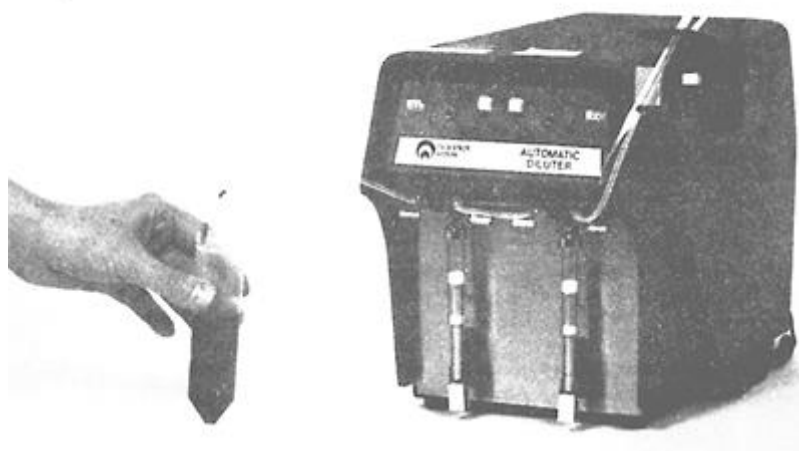


Figura 1-7 Ejemplo un diluidor-dispensador del tipo de doble jeringa.

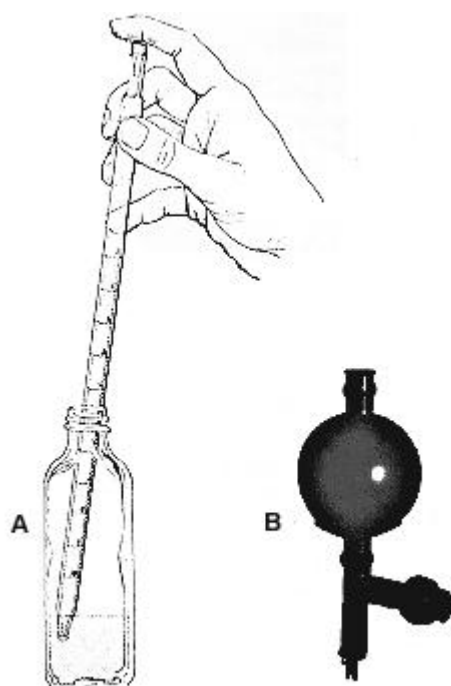


Figura 1-8 A, Técnica apropiada de pipeteo como se describe en el texto. B, Ejemplo de bulbo de hule para pipeteo usado para aspirar muestra dentro de la pipeta.

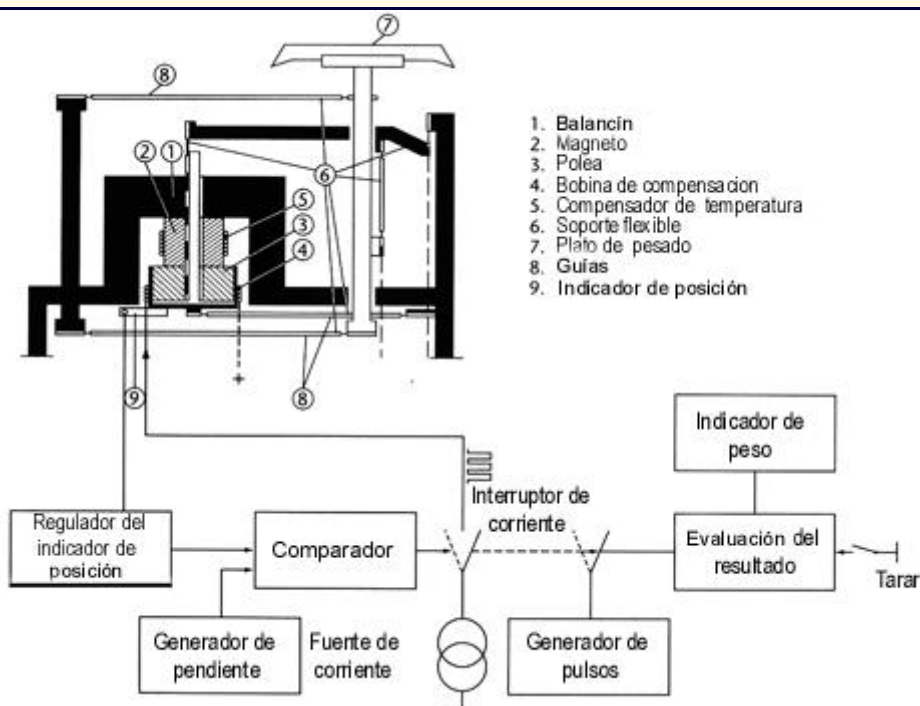


Figura 1-9 Cambiando el principio de una fuerza electrónica compensadora en una balanza. (Cortesía de The Mettler Instrument Corp., Highstown, N.J.)

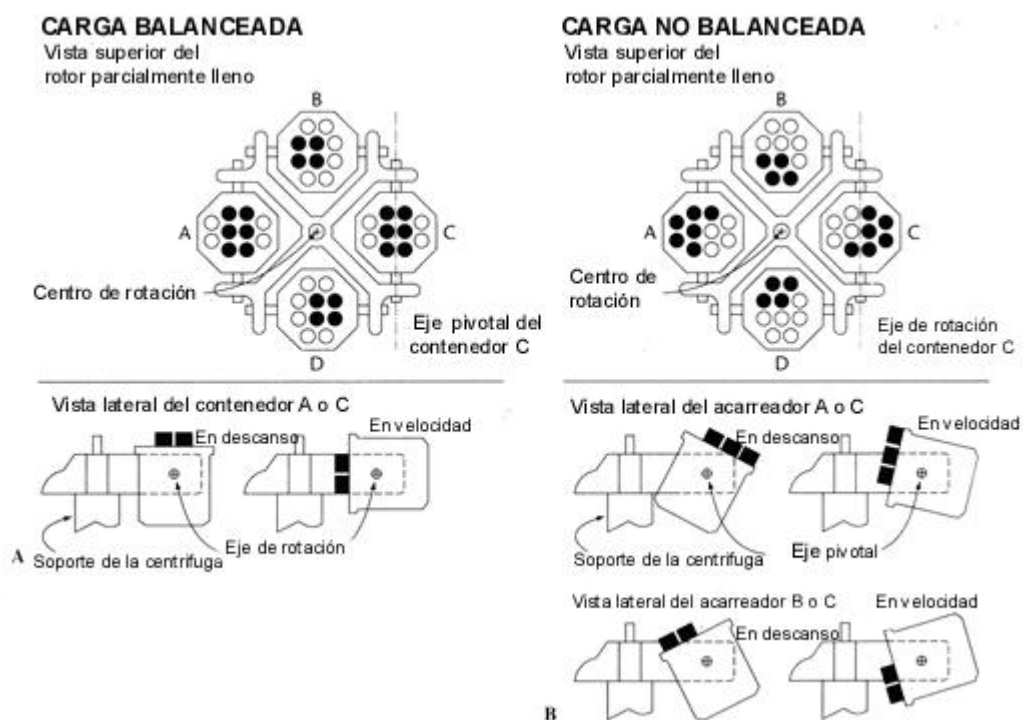


Figura. 1-10 Ejemplos de cargas balanceadas y no balanceadas. **A**, Suponiendo que todos los tubos han sido llenados con una cantidad igual de líquidos, podemos decir que la carga de ese rotor está balanceada. Los soportes opuestos A-C y B-D están cargados con un número igual de tubos que están balanceados con respecto al centro de rotación. Cada soporte es también balanceado con respecto a su eje central o eje pivotal. **B**, Aunque todos los tubos están llenos con una cantidad igual, este rotor está cargado o balanceado inapropiadamente, ninguno de los soportes cargados está balanceado con respecto a su eje pivotal o punto central. A velocidades de operación los soportes A y C no alcanzan la posición horizontal. Soportes B y D sobrepasan la posición horizontal. También nótese que el arreglo de los tubos en los soportes opuestos B y D no están simétricamente con respecto al centro de rotación. (Reprinted from *A Centrifuge Primer*, Spinco Division of Beekman Instruments, {Palo Alto, CA, 1980, para permiso de Beekman Instruments, Inc.})

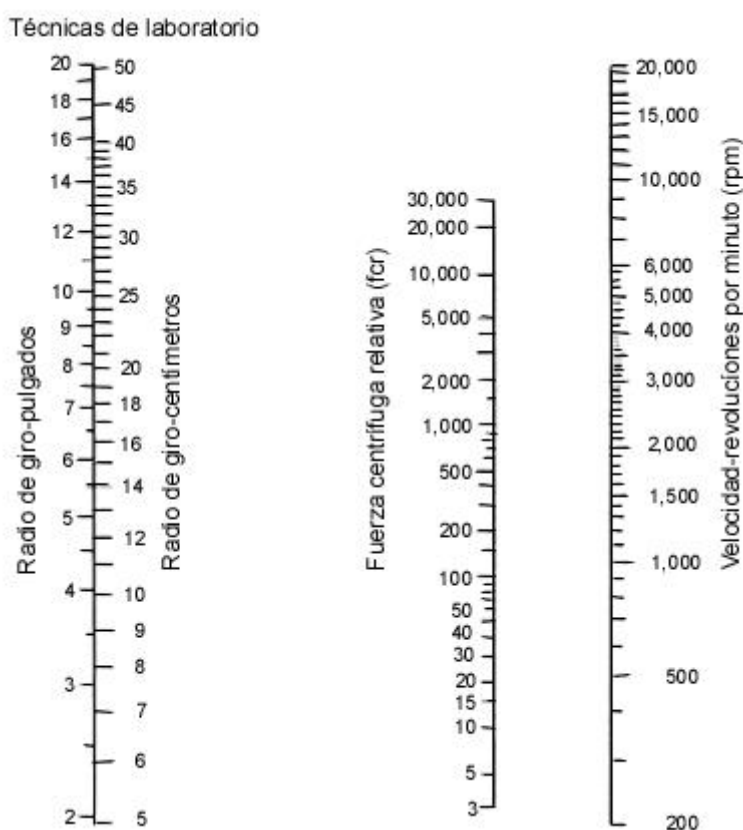


Figura 1-11 Nomograma para relacionar la fuerza centrífuga relativa, RCF con las revoluciones por minuto, rpm.

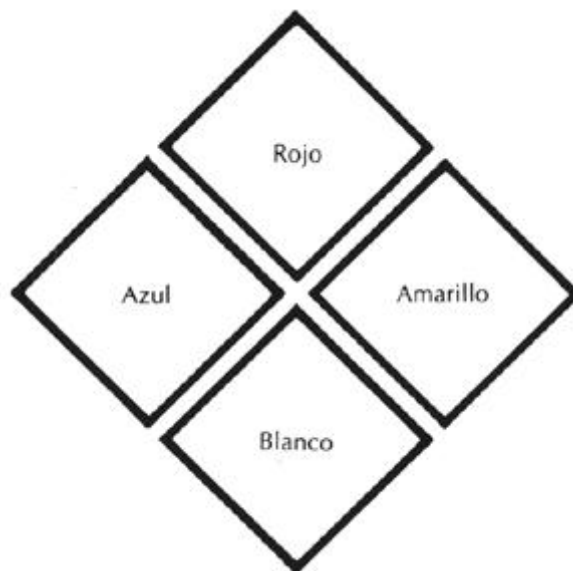


Figura 1-12 Sistema de identificación de la Asociación Nacional para Protección contra el Fuego ("National Fire Protection Association"). (From Bauer JD: *Clinical laboratory methods*, ed 9, St Louis, 1982, Mosby.)



Figura 1-13 Etiquetas DOT. (Departamento de Transportes, "Department of Transportation" en inglés).



Figura 1-14 Etiquetas de riesgo biológico.

46 Técnicas de laboratorio

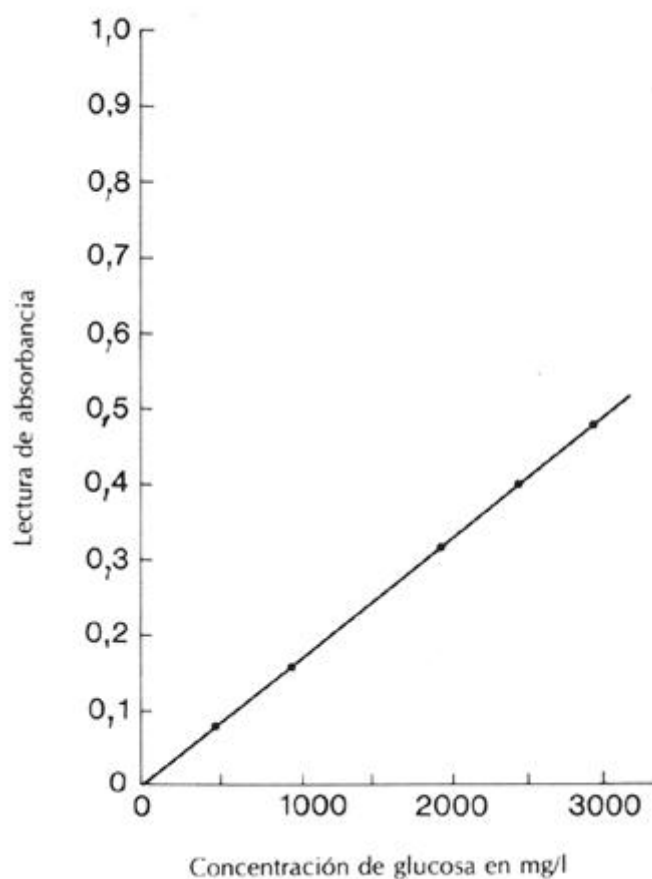


Figura 1-15 Curva estándar para el análisis de glucosa. Se representa gráficamente la absorbancia vs. la concentración en escala lineal.

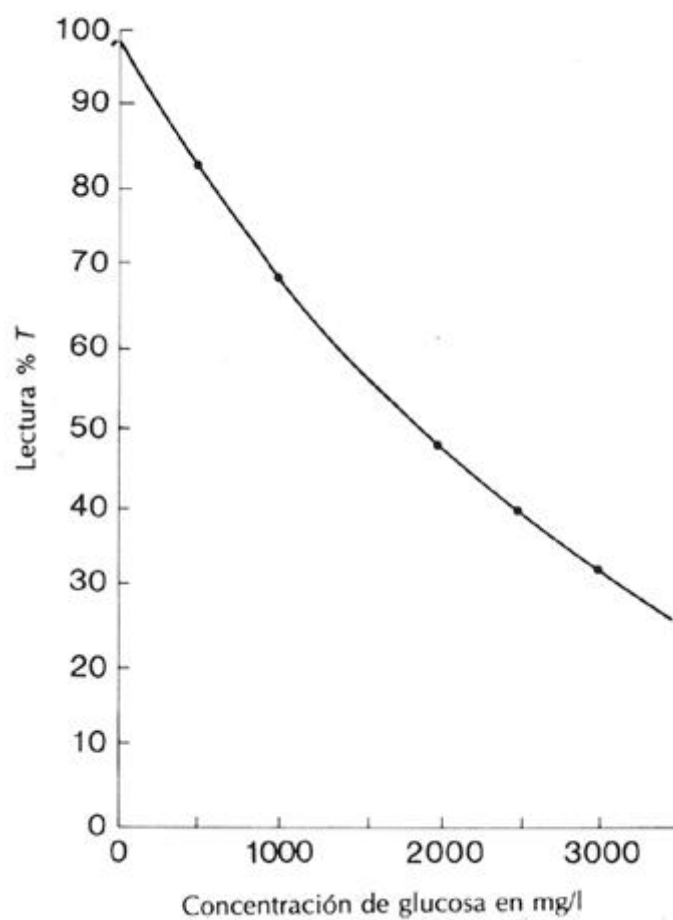


Figura 1-16. Curva estándar para el análisis de glucosa. Se representa gráficamente el porcentaje de transmitancia (%T) vs. la concentración en escala lineal

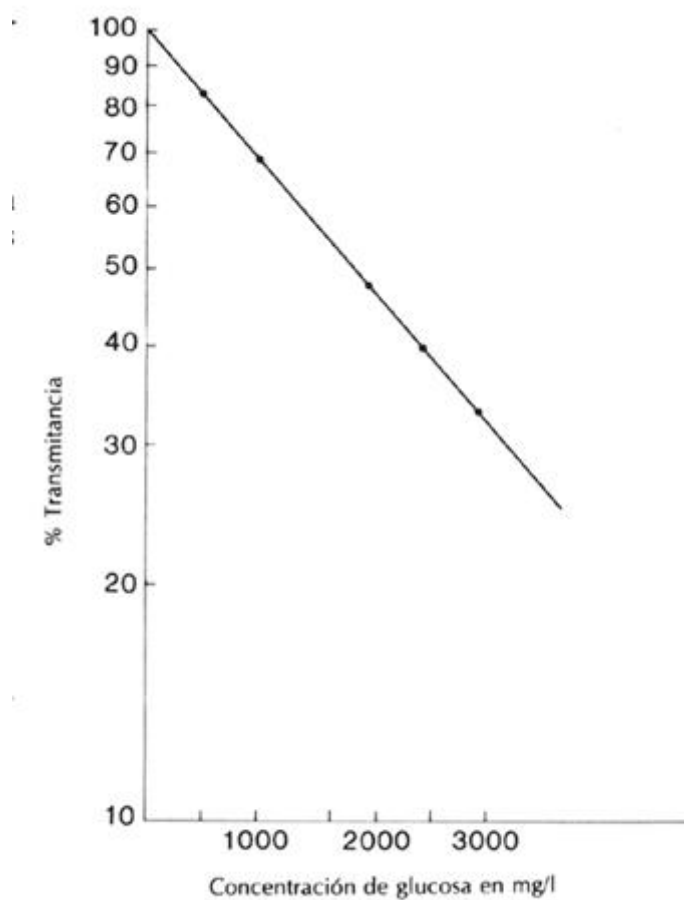


Figura 1-17 Curva estándar para el análisis de glucosa. Se representa gráficamente el porcentaje de transmitancia (%T) vs. la concentración en escala log-lineal.

CAPÍTULO 2

2. Administración del Laboratorio

Lawrence J. Crolla

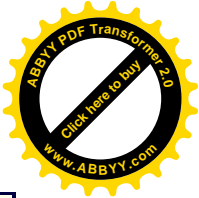
Paul W. Stiffler

Robert W. Lang

Delores Wishart

Regulaciones

CLIA '88



Estructura administrativa del hospital

- Organización del hospital

- Organización del laboratorio químico clínico

- Papel de la administración

Comunicación de la administración

- Comunicación dentro de la organización total

- Comunicación dentro del laboratorio

Administración del personal

- Personal

- Descripciones de trabajo o posiciones

- Horarios de trabajo

- Educación continua y competencia de los empleados

- Escalafón de carreras

Administración de los recursos

Administración financiera

- Presupuesto

- Justificación del Capital

- Compras

- Contabilidad de Costos

- Revisión general sobre aspectos de reembolso

Manejo de la información

- Desempeño financiero

- Productividad

- Utilización de las pruebas

- Tiempo de entrega de resultados

Mejoramiento continuo de la calidad

- Monitores de aseguramiento de la calidad

Términos clave

patógenos sanguíneos Los microorganismos patógenos que están presentes en la sangre humana pueden causar enfermedades en los humanos. Estos patógenos incluyen, pero no están limitados a, Virus de la Hepatitis B (HBV) y Virus de la Inmunodeficiencia Humana (HIV).

CAP El Colegio de Patólogos Americanos (“College of American Pathologists”).

CLIA '88 Modificaciones para las Mejoras del Laboratorio Clínico, 1988. (“Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988”).

consideración de juez Equivalencia entre requerimientos de acreditación/requerimientos estatales y estándares de la CLIA.

control de calidad (“*Quality Control*” o “*CC*”) Procedimientos para monitorear y evaluar la calidad del proceso analítico de cada método a fin de asegurar la exactitud y confiabilidad de los resultados de las pruebas y reportes de los pacientes.

demandas del nivel de servicio Requisitos del laboratorio para la colecta de muestras y el tiempo de entrega de resultados.

demográficos Datos personales acerca de una población específica.

equivalente de tiempo completo (“*Full Time Equivalent*” o “*FTE*”) Empleado programado para trabajar 8 horas diarias, 260 días; ó 10 horas por día, 208 días; ó 2080 horas por año.

HCFA Administración Financiera del Cuidado de la Salud (“*Health Care Financing Administration*”).

HHS Departamento de Salud y Recursos Humanos (“*Department of Health and Human Services*”).

JCAHO Comisión Conjunta para la Acreditación de Organizaciones del Cuidado de la Salud (“*Joint Commission on Accreditation of Healthcare Organizations*”).

Medicaid Un programa patrocinado por el gobierno federal, estatal, y local en Estados Unidos, para proveer beneficios a los que necesitan atención médica sin importar la edad que tienen.

Medicare Un programa de atención médica y servicios hospitalarios patrocinado por el gobierno federal Estadounidense para personas mayores de 65 años.

mezcla de pacientes El porcentaje de pacientes en una población hospitalaria con Medicare, Medicaid, pago privado y servicios caritativos.

modelo de complejidad Los siete criterios usados para categorizar los sistemas de ensayos y exámenes de pruebas, basados en las calificaciones asignadas como 1, 2, ó 3 dentro de cada categoría.

OSHA La Administración de la Salud y Seguridad Ocupacional de Estados Unidos (“*Occupational Safety and Health Administration*”).

productividad Eficiencia en la producción expresada como unidades de trabajo dividida entre horas o puestos definidos.

programa de aseguramiento de la calidad (“*Quality Assurance*” o “*QA*”, en inglés) Programa designado para: 1) monitorear y evaluar la calidad del proceso de las pruebas, la calidad total del proceso, la efectividad de sus normas, y procedimientos; 2) identificar y corregir problemas, asegurar la exactitud, confiabilidad, y el reporte rápido de los resultados de las pruebas; y 3) asegurar un personal adecuado y competente.

prueba de alta complejidad Aquella prueba con una calificación de 13 o más alta por el sistema de categorización en el modelo de complejidad.

prueba de complejidad moderada Prueba con una calificación de 12 o menos por el sistema de categorización en el modelo de complejidad.

pruebas dispensadas Sistemas de pruebas de exámenes de laboratorio con procedimientos simples los cuales son aceptados por la FDA para ser usados en casa; éstas emplean metodologías que son tan simples y exactas como para dar la probabilidad de obtener resultados erróneos insignificantes sin tener riesgo de afectar la salud del paciente si la prueba es realizada incorrectamente.

reforzamiento Cuando los directores crean un ambiente propicio en el cual su personal puede aprender, crecer, mejorar, y funcionar eficazmente.



Registro Federal Provee un sistema uniforme para ofrecer al público regulaciones y noticias legales instituidas por agencias federales de Estados Unidos.

sistema de información del hospital Minimarcos, macromarcos, o marco principal de computadoras.

A través de la realización de análisis en varios especímenes biológicos, el personal del laboratorio de química clínica provee a los médicos de información que puede ser útil en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades. El laboratorio no solo debe cumplir con las regulaciones legales de operación, sino que también debe llevar a cabo las pruebas de tal forma que resulten costeables. El balance de estos requerimientos es responsabilidad del personal que administra el laboratorio. La producción de resultados de pacientes requiere de una infraestructura compleja compuesta del sistema de pruebas (analizadores, reactivos, procedimientos de las pruebas, etc.), personal que realice los análisis, personal administrativo y sistemas para la integración de los resultados del laboratorio con un hospital u otro sistema de información.

La forma en que el laboratorio debe operar está delineado en gran detalle por regulaciones federales. Las más importantes de éstas se encuentran en las Modificaciones para las Mejoras del Laboratorio Clínico ("Clinical Laboratory Improvement Amendments, 1988" o "CLIA '88", en inglés). Las metas de estas regulaciones son asegurar la calidad de los resultados de laboratorio sin tener en cuenta donde fueron realizadas las pruebas. Estas regulaciones cubren la mayoría de los aspectos de las pruebas de laboratorio, incluyendo pruebas de control externo de la calidad, aprobación de los programas externos de control, administración de las pruebas a los pacientes, control de calidad, personal, aseguramiento de la calidad, inspecciones, y asesorías. Otras regulaciones federales y estatales regulan la eliminación de desechos químicos, uso de sustancias radiactivas, y la seguridad de los empleados, incluyendo el delineamiento de las precauciones universales para el manejo de especímenes biológicos.

Debido a la gran influencia de la CLIA '88 en la administración del laboratorio, gran parte de este capítulo se referirá a las secciones de estas regulaciones. Por lo tanto vamos a empezar por revisar los aspectos regulatorios de los laboratorios.

Regulacions

En la actualidad una gran parte de la administración del laboratorio está dedicada a asegurar que éste cumpla con las regulaciones federales, estatales, y locales que ahora existen. El laboratorio de un hospital necesita estar certificado por la Administración Financiera del Cuidado de la Salud ("Health Care Financing Administration" o "HCFA", en inglés), por una agencia privada de certificación, o por una agencia estatal que haya recibido la "categoría de juez." Estas agencias certificadoras inspeccionan los laboratorios para determinar si éstos cumplen con las regulaciones federales, incluyendo la CLIA '88. El Colegio de Patólogos Americanos ("The College of American Pathologists" o "CAP", en inglés) y la Comisión Conjunta para la Acreditación de Organizaciones del Cuidado de la Salud ("Joint Commission on Accreditation of Healthcare Organizations" o "JCAHO" en inglés) son dos de las agencias certificadoras a las que les han otorgado la *consideración de jueces* para actuar en nombre del



gobierno federal. Los bancos de sangre requieren inspecciones de otras agencias certificadoras.

Las regulaciones de la CLIA '88 se aplican en casi todos los laboratorios en los Estados Unidos que estén realizando pruebas para valorar la salud de seres humanos. Las regulaciones están divididas en varias subdivisiones; las subcategorías más importantes son el control externo de la calidad, control de la calidad, administración de las pruebas a los pacientes, y aseguramiento de la calidad.

"Modificaciones Para Mejorar Los Laboratorios Clínicos" O CLIA '88

La sección de control externo de la calidad ("*proficiency testing*" o "PT", en inglés) enumera las pruebas que serán evaluadas bajo los programas de control externo con regulación federal. También da una lista de las calificaciones necesarias para pasar tales pruebas y la documentación necesaria cuando un laboratorio presenta deficiencias en la prueba de control externo de la calidad.

La sección de administración de las pruebas a los pacientes tiene que ver con la requisición de la prueba y el reporte de sus resultados. Esta sección también especifica por cuánto tiempo deben guardarse los registros y define la documentación necesaria para cualquier problema que ocurra en el proceso de reporte.

La sección de control de calidad ("CC"), especifica como debe hacerse el control de calidad y con que frecuencia. También cubre todo lo relacionado a los manuales de procedimientos (ver el cuadro abajo) y la documentación necesaria para introducir una nueva prueba al laboratorio.

La sección de personal define las responsabilidades, educación, entrenamiento, y experiencia requerida para cada posición que el personal ocupe, así como el lugar donde serán llevados a cabo los exámenes de moderada o alta complejidad.

La sección de Control de Calidad maneja los diversos *monitores* que deben ser evaluados para asegurar que el laboratorio esté produciendo un trabajo de calidad. Si todos los monitores son evaluados en un programa consistente, de acuerdo con los lineamientos presentados en esta sección, los laboratorios estarán cumpliendo con la mayoría de las regulaciones y no deben temer a las inspecciones sorpresivas.

El proceso de inspección por el organismo llamado Salud y Servicios Humanos ("Health and Human Services" o "HHS", en inglés) o uno designado por éste se describe en detalle. El fracaso en una inspección o la obstrucción de la misma tendrá severas consecuencias.

Otra regulación federal muy importante para los laboratorios es el Acta de Seguridad de la Salud Ocupacional ("Occupational Safety and Health Act", en inglés) de 1970. Bajo esta acta, la Administración de la Salud y la Seguridad Ocupacional ("Occupational Safety and Health Administration" u "OSHA", en inglés) está autorizada para implementar regulaciones que garanticen la operación de un laboratorio seguro. La OSHA cubre todas las formas de seguridad, desde el ambiente físico hasta el trabajo con sustancias químicas y patógenos sanguíneos. El capítulo 1 discute varios de los aspectos de las regulaciones de la OSHA.

Muchas organizaciones han emitido lineamientos concernientes en cuanto al tiempo que deben conservarse los registros de laboratorio (Tabla 2-1). Ya que las agencias que

emiten estos lineamientos también acreditan hospitales y laboratorios; estos lineamientos tienen la fuerza de la ley.

El laboratorio debe dedicar tiempo al cumplimiento de estos aspectos, ya que puede ser multado por la violación de cualquiera de las regulaciones federales de la OSHA o la CLIA '88. También se requiere de la certificación de la CLIA '88 para el reembolso del Medicare (un sistema de atención a la salud en los Estados Unidos), que resulta ser otra fuerte motivación para realizar su cumplimiento.

Una de las acciones más importantes que el laboratorio puede tomar para asegurar el cumplimiento de las regulaciones es obtener copias de las mismas y ponerlas a la disposición del personal. Otra buena medida es formar un comité regulatorio con representantes de cada sección del laboratorio. El comité puede ayudar a formular las normas y procedimientos necesarios para que el laboratorio realice educación interdepartamental e inspecciones para mantener al día sus responsabilidades. El cumplimiento con las regulaciones sólo se puede alcanzar involucrando a todo el personal.

Lo que Debe Incluir Cada Manual de Procedimientos

El manual de procedimientos debe incluir lo siguiente, cuando sea aplicable para el procedimiento de la prueba:

1. Requerimientos para la colecta y procesamiento de la muestra así como los criterios de rechazo de la misma.
2. Procedimientos para exámenes microscópicos, incluyendo la detección de laminillas preparadas incorrectamente.
3. Desempeño del procedimiento paso a paso, incluyendo cálculos de las pruebas e interpretación de resultados.
4. Preparación de laminillas, soluciones, calibradores, controles, reactivos, colorantes y otros materiales usados en las pruebas.
5. Procedimientos de calibración y verificación de la calibración.
6. El intervalo de reporte para resultados de pruebas de pacientes establecido y verificado por la CLIA, Sección 493.1213.
7. Procedimientos de control.
8. Acciones correctivas a seguir cuando los resultados de calibración o controles no cumplen los criterios de aceptabilidad del laboratorio.
9. Limitaciones en metodologías, incluyendo sustancias interferentes.
10. Intervalos de referencia (valores normales).
11. Resultados que indican que la vida del paciente está en peligro o valores críticos.
12. Literatura de referencias pertinentes.
13. El criterio apropiado de almacenamiento y preservación que aseguren la integridad de la muestra hasta que las pruebas sean realizadas completamente.
14. Los sistemas de laboratorio para reporte de resultados incluyendo, cuando sea apropiado, el protocolo para el reporte de valores críticos.
15. Descripción del plan de acciones a tomar en el evento de que el sistema repentinamente esté fuera de servicio.
16. Criterios para referir especímenes incluyendo procedimientos para



su sometimiento y manejo como lo describe la CLIA, sección 493.1103.

Estructura de la Administración Hospitalaria

Organización de un hospital

El tamaño, la base de pacientes (tipo de paciente con respecto al aspecto socioeconómico), el mercado y las afiliaciones de un hospital afectan la estructura de su organización. La Fig.2-1 ilustra una estructura de organización común para un hospital de 200 a 300 camas. Los hospitales más grandes tendrán una estructura similar. Es importante notar que cada vicepresidente tiene varios departamentos a su cargo. Ya que ellos no pueden ser expertos en todas las áreas, deben trabajar muy de cerca con los directores de cada departamento a su cargo. Cada departamento tiene su propia estructura interna, dependiendo de sus funciones específicas. En general, hay un flujo de responsabilidad desde el administrador de menor categoría hasta el administrador de mayor categoría, llegando hasta el director general. La importancia de los aspectos fiscales es tan grande que la mayoría de los departamentos tienen una línea de responsabilidad directa con el departamento financiero (ya sea que aparezca o no oficialmente en el diagrama de flujo de responsabilidades) para emitir cheques, fondos de investigación y compras. Generalmente existe un pequeño fondo fijo para el mantenimiento de computadoras tanto del hospital como del laboratorio. Las computadoras del hospital procesan información demográfica y financiera de los pacientes, mientras que las computadoras del laboratorio procesan los datos de las pruebas realizadas en el laboratorio (ver Capítulo 18).

Organización de un laboratorio de química clínica

Los departamentos de patología deben tener un diagrama de flujo general que muestre la relación jerárquica entre las diferentes posiciones del personal en cada laboratorio o sección. Esto ayuda a cada persona a entender la cadena de autoridad. Este diagrama de flujo muestra las líneas de "cortesía" para reportarse, así como el reporte directo y cualquier otro factor ajeno que afecte fuertemente la organización ya estructurada. El esquema típico de un Departamento de Patología se ilustra en la Fig.2-2.

Dentro de cada laboratorio clínico, debe haber un diagrama de organización bien detallado que muestre la estructuración de cada sección del laboratorio. En la Fig. 2-3 se muestra el esquema de un laboratorio de química clínica "típico". La subdivisión de un laboratorio clínico en departamentos, secciones o unidades y luego en turnos, debe ser hecha de manera que permita al laboratorio en particular usar el espacio, instrumentos, reactivos y personal eficientemente y de manera flexible para cubrir las demandas del servicio esperado por el laboratorio. Por lo tanto, puede ser que el laboratorio no pueda hacer divisiones en departamentos correspondientes a las especialidades y subespecialidades descritas en las regulaciones finales de la CLIA '88 publicadas en Febrero 28, 1992, en el *Registro Federal* ("Federal Register" en inglés). Todas las pruebas de laboratorio deben ser realizadas y supervisadas por personal calificado y apropiadamente capacitado (ver abajo y pág. 50).

Bajo la CLIA '88, están explícitos los requerimientos de educación, certificación, y experiencia para el *director de un laboratorio* que realiza pruebas de moderada y alta



complejidad (secciones 493.1405, 493.1406, y 493.1443). Estos requerimientos están resumidos en las Figuras 2-4 y 2-5. También, un profesional con licencia estatal de Doctor en Medicina M.D., Doctor en Osteología D.O., Doctor en Medicina Física D.P.M. o Doctor en Bioquímica puede servir como el consultor clínico del laboratorio; quien se dedica a la interpretación de los datos de pruebas de laboratorio de moderada y alta complejidad para el personal del laboratorio. Si el laboratorio solo realiza pruebas de moderada complejidad, debe contar con un especialista técnico y el personal que realice las pruebas. Si el laboratorio realiza pruebas de alta complejidad, éste debe designar a un supervisor general y a un supervisor técnico. La CLIA '88 define un supervisor técnico como alguien que actúa como supervisor principal del laboratorio (Jefe de Laboratorio), mientras que un supervisor general (Jefe de Sección) actúa como un supervisor inmediato a lo realizado en las mesas de trabajo, revisando el trabajo diario y el control de calidad. Los requisitos de personal de laboratorio bajo la CLIA '88 están siendo modificados constantemente. Por favor consulte las regulaciones antes de hacer cualquier decisión.

Habilidades para administrar y características personales

Las habilidades para administrar y las características personales de un director de laboratorio determinan el ambiente de trabajo diario en el laboratorio clínico. Un equipo profesional motivado no sólo es capaz de proveer el nivel de servicio esperado por el personal médico, pacientes hospitalizados y pacientes de consulta externa, sino que también es capaz de establecer y alcanzar sus metas estratégicas.

En la Tabla 2-2 se enumeran muchas habilidades de administración positivas y características personales. El director del laboratorio debe enfocarse en las habilidades y características que encajan en su propia personalidad y en la personalidad de sus empleados.

Además de trabajar con sus fortalezas, los buenos directores de laboratorio deben identificar las debilidades que a través de la educación y el entrenamiento formal pueden convertirse en habilidades o encontrar los recursos (planes, gente) que haya disponibles para compensar esa deficiencia. Aunque el personal técnico del laboratorio recibe entrenamiento para las tareas específicas que desempeña, los directores de laboratorio raramente reciben un entrenamiento en administración. Es importante proveer al director del laboratorio ambos entrenamientos: técnico y administrativo. El estilo personal del director del laboratorio, el cual es el resultado de las habilidades para administrar y las características personales, determinará fuertemente que tan fácil y que tan bien el laboratorio alcance sus metas.

La mezcla de las habilidades para administrar y las características personales serán diferentes para cada director exitoso del laboratorio por tres razones básicas. La primera es que cada equipo que dirige la administración de un hospital y cada personal del laboratorio tienen sus propias y únicas personalidades. La segunda es que cada hospital tiene un plan estratégico diferente con metas específicas para ser alcanzadas por el laboratorio, además del mantenimiento de su nivel de servicio. La tercera razón es que la cantidad y tipo de recursos designados al laboratorio para mantener sus operaciones diarias, variarán de institución a institución.

Administración de la Comunicación



Comunicación dentro de la organización total

El director del laboratorio debe comunicarse efectiva y frecuentemente con los administradores apropiados del departamento y del hospital, departamentos del hospital, comités del hospital, así como con el personal médico, para mantenerlos informados sobre los progresos del laboratorio dirigidos a cumplir las metas del hospital. Esta es también una buena oportunidad para el director del laboratorio de mantenerse informado de cualquier cambio en el plan estratégico o metas, o en la prioridad de éstas. Todas las comunicaciones interdepartamentales deben ser formalmente documentadas. Cuando existan problemas, todos los hechos deben recopilarse y determinarse el impacto que el problema tuvo sobre los pacientes o el nivel de servicio. Se consideran posibles soluciones y se desarrolla un plan de medidas correctivas. El problema, el plan de acción, y su resultado deben ser documentados. Después de un tiempo apropiado, tanto el problema original como la solución deben ser revisados y reevaluados por cada uno de los involucrados.

Además de resolver problemas que se presenten en el momento, el director del laboratorio debe usar frecuentemente modos formales de comunicación, para mantener una relación profesional y cooperativa con el personal médico. Los modos de comunicación pueden incluir participación en las rondas médicas diarias, participación en la enseñanza de casos clínicos por departamentos y del hospital en general, y publicación de folletos informativos. Estos recursos permiten que el laboratorio mantenga al personal médico oportunamente informado sobre los cambios en el campo de las ciencias del laboratorio y en el propio laboratorio (por ejemplo, nuevos métodos, disponibilidad de pruebas, o nuevas pruebas) y otorga al personal médico la oportunidad de estar enterado de los futuros cambios. Un cambio en las normas del laboratorio sin la revisión y la conexión con el personal médico apropiado pone tal cambio en riesgo de fracasar.

El director del laboratorio también debe ser apto para usar sus habilidades políticas a fin de representar los intereses y preocupaciones del personal del laboratorio ante el hospital entero, especialmente cuando los recursos son limitados, y son necesarios material adicional, espacio y personal. Las habilidades políticas también son requeridas para negociar acuerdos, promover entendimientos y cooperación dentro de la organización total. Nunca será suficientemente enfatizado que se espera que el director del laboratorio además de ser un defensor del laboratorio, sea también un leal miembro del personal administrativo.

Comunicación dentro del laboratorio

Dos herramientas efectivas que pueden ayudar a los directores de laboratorios a tener éxito son dirección participativa y reforzamiento. Para que estas herramientas sean usadas en forma efectiva, se debe mantener bien informado al personal con información exacta y oportuna.

Para una dirección participativa, el personal del laboratorio debe tener un claro entendimiento del nivel de servicio que se necesita proveer (carga de trabajo), las metas a largo plazo que deben ser alcanzadas (plan estratégico) y los recursos que han sido asignados para cumplir con estas tareas. Con esta información, el personal del laboratorio puede participar activamente en la planeación. Después de comunicar claramente las metas del laboratorio, el director puede permitirle al personal que participe en la preparación de los objetivos, la planeación y la solución de problemas. La perspectiva de los químicos y



supervisores es claramente diferente de la del director del laboratorio y cada uno puede contribuir a la planeación general. Ésta es una manera efectiva que tiene el director para establecer visibilidad, accesibilidad, credibilidad con el personal, y ganar confianza y respeto. También dando y recibiendo retroalimentación positiva o negativa, ayuda a motivar al personal para alcanzar sus metas.

Ningún director debe asumir que el personal del laboratorio tiene capacidad ilimitada o que no tiene umbral de agotamiento. Con el uso de retroalimentación positiva en forma regular, el personal muy dedicado puede alcanzar metas hercúleas bajo condiciones poco frecuentes. Sin embargo, un buen director reconoce que hay limitaciones para la operación del laboratorio en esta forma. La operación de un laboratorio debe contar con un número apropiado de personal que lleve a cabo las pruebas, con los reactivos y equipos necesarios para procesar la carga de trabajo rutinaria y para lograr las metas del plan estratégico.

El director necesita estar en contacto constante con el personal técnico, ya sea directamente o a través del personal supervisor, para monitorear el progreso de las tareas asignadas. Esto puede hacerse en forma de juntas informales en el laboratorio o juntas formales con uno más miembros del personal. Las juntas formales deben siempre tener una agenda. El director puede comunicarse con el personal por memoranda, boletines, correo electrónico, teléfono, o transmisión de facsímiles. Deben hacerse minutas de cada junta con el personal ya sea individual o en grupos. Las minutas deben establecer claramente el resultado de la junta, incluyendo metas que han sido establecidas o acciones que deben ser tomadas. Las minutas de las juntas deben ser distribuidas entre cada uno de los asistentes o entre los que generalmente asisten a una junta. La comunicación frecuente acorta el período de tiempo en el que, el director o el personal, pudieran estar desviados del cumplimiento de las metas y permite una constante revaloración del plan de acción.

Administración del Personal

Personal

La CLIA '88 ha creado categorías de trabajo para todos los químicos en el laboratorio clínico. También ha establecido requerimientos uniformes que incluyen la educación mínima y experiencia que una persona debe tener para dirigir, consultar, supervisar, o realizar cada prueba específica en especímenes humanos. Estas categorías de trabajo son descritas en las regulaciones finales de la CLIA '88, publicadas en el *Registro Federal* del 28 de febrero de 1992, y en la corrección de las modificaciones publicadas en el *Registro Federal* el 19 de enero de 1993, 22 de julio de 1993, 24 de abril de 1995, y el 15 de mayo de 1995.

De acuerdo con la CLIA '88, los requerimientos de educación y experiencia para cada categoría de trabajo dependen del grado de complejidad de las pruebas que se realizan en el laboratorio. El modelo de complejidad de pruebas asigna todas las pruebas a una categoría, de cuatro que existen: dispensadas, microscopía realizada por médicos, de moderada complejidad o alta complejidad. La HCFA clasifica cada prueba de acuerdo al método, instrumento, reactivo, y complejidad. Estas clasificaciones de pruebas son publicadas periódicamente en el *Registro Federal* y hasta que una prueba es clasificada, es considerada



altamente compleja. No existen requerimientos de educación o experiencia para el personal que realiza el reporte de resultados de pruebas dispensadas. Actualmente las pruebas dispensadas incluyen algunos procedimientos usados para pruebas en casa. Si las pruebas realizadas en el laboratorio son clasificadas como de moderada complejidad (es decir que no se realizan pruebas de alta complejidad), el laboratorio debe tener un director, un especialista técnico, un especialista clínico, y personal que lleve a cabo las pruebas. Los requerimientos de educación y experiencia o entrenamiento para cada una de estas posiciones son menos estrictos que aquellos requeridos para los puestos en que se realizan pruebas de alta complejidad.

Cuando se realizan pruebas de alta complejidad (ya sea que se realicen o no pruebas de moderada complejidad), el laboratorio debe tener un director, supervisor técnico, especialista clínico, supervisor general, y personal que realicen las pruebas. Este personal debe tener al menos un nivel educativo de técnico o un certificado de preparatoria o su equivalente, y haber estado haciendo pruebas de alta complejidad. Según el documento del 19 de enero de 1993; el trabajo del personal con la última categoría mencionada debe ser revisado dentro de 24 horas por un supervisor. A partir de 1997, los individuos que no tienen un nivel de técnicos en ciencias del laboratorio o que no cumplan con los requisitos del registro federal, sección 493.1489 escritos el 24 de abril de 1995, no serán aceptados para realizar pruebas de alta complejidad. Toda persona elegible para hacer pruebas de alta complejidad también puede realizar pruebas de moderada complejidad. Los directores de laboratorio deben mantenerse actualizados en las adiciones, cambios, y eliminaciones de estas calificaciones del personal a medida que vayan siendo emitidas por la HCFA.

El director del laboratorio debe identificar la categoría de cada prueba ya sea de tipo liberado, de moderada complejidad, o de alta complejidad, para que el personal adecuadamente entrenado y supervisado las realice. La mezcla de pruebas, el volumen de ellas, el nivel de servicio incluyendo la frecuencia de la prueba y el tiempo de entrega de resultados, determinarán entonces el número y tipo de supervisores y posiciones del personal que realice las pruebas, que sean necesarias para cumplir con la CLIA '88 y proveer un servicio adecuado.

Descripción de las posiciones de trabajo

Cada posición del personal técnico y operativo debe tener por escrito una descripción de trabajo dividida en tres partes. Una parte debe establecer como mínimo el grado de educación y experiencia o entrenamiento requeridos por la CLIA '88 para esa posición. Cada requerimiento adicional formulado por el laboratorio debe ser incluido. La segunda parte debe documentar las pruebas específicas que se deben realizar o supervisar e indicar la clasificación de cada prueba: liberada, moderada, o de alta complejidad. La descripción del trabajo debe indicar si el individuo que desempeña esa posición realizará o supervisará cada análisis. Es esencial verificar los documentos educativos de cada miembro del personal para asegurarse de que cuentan con los requerimientos de la CLIA '88 para realizar, dirigir, o supervisar pruebas específicas. La tercera parte de la descripción del trabajo, contiene como mínimo las responsabilidades generales de una posición específica, los requerimientos de la CLIA '88 que debe cumplir y los estándares para un desempeño aceptable.

De acuerdo a los requerimientos en el documento 493.1425 de la CLIA '88, el personal



que realice las pruebas de moderada complejidad será responsables de procesar la muestra, realizar la prueba, y reportar los resultados.

- a. "Cada individuo sólo realizará aquellas pruebas de moderada complejidad que son autorizadas por el director del laboratorio y que requieren el grado o la habilidad proporcional a la educación, entrenamiento o experiencia y destreza técnica que posee.
- b. Cada individuo que realice pruebas de moderada complejidad debe:
 - (1) Seguir los procedimientos del laboratorio para el manejo y procesamiento de la muestra, análisis de la prueba, reporte y mantenimiento de registros de los resultados de las pruebas de pacientes;
 - (2) Mantener los registros que demuestren que se están corriendo muestras de control externo de calidad de la misma forma que se corren las muestras de pacientes;
 - (3) Apegarse a las prácticas de control de calidad del laboratorio, documentar todas las actividades de control de calidad, calibraciones de instrumentos y procedimientos, y mantenimiento llevados a cabo;
 - (4) Seguir las normas y procedimientos del laboratorio establecidos para acciones correctivas cada vez que los sistemas de prueba no estén dentro de los niveles aceptables de desempeño;
 - (5) Ser capaz de identificar problemas que pueden afectar adversamente la realización de las pruebas o el reporte de los resultados y corregir los problemas o notificar inmediatamente al consultor técnico, consultor clínico o director; y
 - (6) Documentar todas las acciones correctivas tomadas cuando el sistema se desvíe de las especificaciones establecidas por el laboratorio".

De acuerdo con el documento 493.1495 de las regulaciones finales de la CLIA '88, para pruebas de alta complejidad, el personal que realice las pruebas es responsable del proceso de la muestra, realización de la prueba, y reporte de los resultados:

- a. Cada individuo realiza sólo las pruebas de alta complejidad, autorizadas por el director del laboratorio y que requieren el grado o la habilidad proporcional a la educación, entrenamiento, o experiencia y destreza técnica que posee.
- b. Cada individuo que realiza pruebas de alta complejidad debe seguir las 6 instrucciones de la lista anterior para hacer pruebas de moderada complejidad. Además, aplicar una séptima instrucción y excepción:
 - (7) "Si está calificado bajo la disposición 493.1489(b)(4), debe llevar a cabo pruebas de alta complejidad sólo con supervisión directa de un supervisor general calificado de acuerdo a la disposición 493.1461."
- c. *Excepción:* "Para individuos calificados bajo la disposición 493.1489(b)(4), que estuvieron realizando pruebas de alta complejidad el 19 de enero de 1993 o antes, los requerimientos del párrafo (b)(7) de esta sección no son efectivos, siempre que toda prueba de alta complejidad realizada por un individuo en la ausencia de un supervisor general sea revisada dentro de las 24 horas subsecuentes por un supervisor general calificado bajo 493.1461".

Una descripción paralela debería ser preparada para cada persona que realiza pruebas, enumerando el nivel de educación de la persona, el grado de complejidad de las pruebas que



puede realizar bajo las reglas de la CLIA y si requiere o no supervisión directa o revisión supervisada. La Tabla 2-3 enumera la información que debe mantenerse en el expediente personal de cada analista.

Horario de trabajo

Puede ser que el horario real para el personal de un laboratorio en particular no sea conforme a los tres turnos estándar de 8 horas por día, con miembros del personal trabajando 5-8 horas al día por semana. Existen formatos alternativos de horarios que incluyen el uso de turnos de 10 horas, tiempo flexible, y turnos escalonados. Muchos laboratorios usarán una combinación de todos estos formatos para alcanzar una cobertura completa. Esto permite una sobreposición entre los turnos y aumenta la comunicación entre ellos y una continuidad en el flujo de trabajo.

Los directores de laboratorio deben tomar en cuenta las fuerzas y debilidades individuales de los químicos cuando planean un horario de trabajo, incluyendo el equilibrio de los químicos con mayores habilidades, con los de menos habilidades para cada turno. Haciendo una cuidadosa revisión de las estadísticas de la carga de trabajo, el director puede determinar si la carga de trabajo está distribuida en forma equitativa dentro del turno y entre los turnos y programar la distribución de horarios del personal de acuerdo a ella. Algunas áreas de trabajo, tales como el laboratorio de terapia intensiva, son posiciones que siempre requieren la presencia de un químico o analista y deben estar siempre ocupadas por el personal.

La distribución del personal en el laboratorio debe tomar en cuenta el número de días que el personal se ausenta por enfermedad, días festivos y vacaciones. Por lo tanto, por cada posición de trabajo cubierta, deben ser contratados entre 1.5 y 2.0 individuos por cada turno para proveer una cobertura de siete días a la semana.

Debido a que el costo más grande para el laboratorio es el de mano de obra, la mayoría de los laboratorios intentan incrementar la productividad (precio de la prueba/equivalentes o empleados de tiempo completo) por medio de la automatización o combinando estaciones de trabajo para incrementar la eficiencia (ver Capítulo 16). En la pág. 57 se discuten otros aspectos de productividad (manejo de recursos).

Educación continua y competencia de los empleados

Educación continua.

Las regulaciones finales de la CLIA '88 establecen que el director del laboratorio o especialista técnico en pruebas de moderada complejidad y el director del laboratorio o supervisor técnico en pruebas de alta complejidad, deben identificar las necesidades de entrenamiento o de educación continua para mejorar las habilidades en el personal. Ellos también deben identificar las necesidades de entrenamiento en cada estación de trabajo y asegurar que cada individuo que esté realizando pruebas reciba entrenamiento interno regularmente, así como la educación apropiada para el tipo y complejidad de los servicios desempeñados por el laboratorio. Por lo tanto, el laboratorio debe mantener una lista actualizada de los programas de educación continua disponibles en la institución o a través de organizaciones profesionales que cubran las necesidades del personal del laboratorio.



El laboratorio puede ofrecer programas sobre temas generales, tales como administración del laboratorio, sistemas de información para laboratorios, regulaciones gubernamentales para el laboratorio, OSHA, seguridad, tecnología del futuro, programas en temas técnicos específicos tales como patofisiología, pruebas en uso actual, e instrumentación. La asistencia a congresos regionales, estatales y nacionales debe ser estimulada cuando los temas y exhibiciones sean pertinentes. La asistencia a todos los programas de educación continua debe ser documentada y mantenida en el expediente personal del empleado.

Aptitud de los empleados.

El director del laboratorio tiene la responsabilidad definitiva de asegurar la aptitud o competencia y la educación continua del personal que realiza las pruebas según las regulaciones finales de la CLIA '88. Los detalles están especificados en las secciones 493.1413(b)(8,9) y 493.1451(b)(8,9), que establecen que el especialista técnico en pruebas de moderada intensidad y el supervisor técnico en pruebas de alta complejidad, respectivamente, son responsables por:

- (8) La evaluación de la competencia de todo el personal que realiza las pruebas y por el aseguramiento de que el personal mantenga su competencia para obtener y reportar resultados de una forma rápida, exacta y eficientemente. Los procedimientos para la evaluación de la competencia del personal deben incluir, pero no están limitados a:
 - (i) La observación directa de la realización de las pruebas de rutina del paciente, incluyendo preparación del paciente, si es aplicable, manejo, procesamiento, y análisis de la muestra;
 - (ii) El monitoreo del registro y reporte de resultados;
 - (iii) La revisión de los resultados intermedios o de las hojas de trabajo, registros de control de calidad, resultados del control externo de la calidad y registro del mantenimiento preventivo;
 - (iv) La observación directa del desempeño en el mantenimiento de los instrumentos y revisiones de su función;
 - (v) La valoración de la realización de las pruebas a través de muestras analizadas previamente, tales como la realización de muestras ficticias o pruebas en muestras de control externo de la calidad;
 - (vi) La valoración de las habilidades para resolver problemas; y
- (9) La evaluación y documentación del desempeño de los individuos responsables de las pruebas de moderada complejidad (especialista técnico) y pruebas de alta complejidad (supervisor técnico), al menos dos veces al año durante el primer año que el individuo trabaja con muestras de pacientes. De ahí en adelante, la evaluación se debe llevar a cabo cada año, a menos que haya cambios de metodología o instrumentos, en tal caso antes de reportar los resultados del paciente, el desempeño del individuo debe ser reevaluado para incluir el uso de la nueva metodología o la instrumentación de prueba."

La frecuencia de las evaluaciones puede ser mayor, de acuerdo a las regulaciones locales.

Además de evaluar la competencia del empleado bajo los requerimientos de la CLIA '88, se valorará rutinariamente la productividad del personal que hace las pruebas y se discutirá



el logro de la meta general con cada individuo. El personal debería saber porque ellos han tenido un desempeño menor, igual, o mejor de lo esperado y a cada quien se le debe dar los medios adecuados para alcanzar un mejor desempeño. Se debe dar al empleado la oportunidad de hacer comentarios en la revisión. Es importante documentar el proceso entero de valoración, dar copias al empleado y guardar copias en el expediente personal. La documentación de valoraciones razonables y frecuentes es importante para el desarrollo del empleado (ver abajo) y también para proveer el marco de trabajo para las acciones disciplinarias necesarias.

Escalafón de carreras

El proceso de entrenamiento continuo y motivación del personal es una parte significativa del trabajo de un director de laboratorio. El trabajo técnico rutinario acoplado con limitadas oportunidades de avance conduce a un alto número de renuncias del personal. El uso de un sistema de escalafón de carrera puede eliminar estos obstáculos y retener al personal. En este sistema, las credenciales y experiencia requeridas para avanzar a la siguiente posición (el siguiente peldaño de la escalera) están claramente delineados. Para establecer un sistema de escalafón de carreras en el laboratorio clínico, se debe formar un grupo de empleados que diseñe y prepare un modelo de programa basándose en las necesidades de los trabajadores y del laboratorio, sometiéndolo después a la dirección para su revisión y aprobación. Una vez aprobado, las etapas de implementación deben ser formalmente establecidas por la dirección y el personal. Este enfoque ayuda a realzar la aceptación del empleado y a concentrar el programa en las necesidades específicas identificadas en el trabajador.

El escalafón básico de carreras da la oportunidad de avance a todos los empleados calificados. Para hacer esto posible, es necesario definir las etapas en el escalafón de carreras, junto con las responsabilidades y privilegios de cada una de ellas. Deben ser creadas las nuevas posiciones con responsabilidades intermedias entre las de los químicos y las de los supervisores. Además, cuando sea posible, el director del laboratorio debería de ascender. Este tipo de norma tiende a desarrollar empleados dedicados y leales los cuales pueden moverse vertical y horizontalmente dentro de la organización. Una vez que un plan de escalafón de carreras es aceptado, la dirección se reúne con cada empleado individualmente con el propósito de establecer metas específicas para ese empleado, incluyendo la implementación de lineamientos, tiempo del que se dispone para terminar esa tarea, y los reconocimientos por su éxito. El director del laboratorio debe monitorear regularmente el progreso de cada empleado, dar retroalimentación y estimulación a los empleados para mantenerlos concentrados en el logro de sus metas.

Las regulaciones finales de la CLIA '88 establecen que cualquier persona por lo menos con un certificado de preparatoria o el equivalente, puede ser capacitada para realizar pruebas de moderada complejidad (493.1423). Es importante que el entrenamiento impartido así como el desempeño queden documentados antes de que se le permita al empleado analizar muestras de pacientes. Esto hace posible que el personal como flebotomistas y auxiliares estén capacitados para realizar pruebas. Debe establecerse el criterio para la promoción del personal que realiza pruebas, a puestos de supervisión dentro del laboratorio. Asimismo, se deben identificar con el sistema de información del laboratorio las posiciones administrativas o



posiciones auxiliares, programas de largo alcance, y puestos que no son del laboratorio. Los requerimientos de capacitación, educación, y las responsabilidades de trabajo de todas las posiciones deben estar por escrito. Los beneficios de promoción para los empleados es la mayor satisfacción del trabajo, educación adicional, reconocimiento de los logros a través de la retroalimentación, una base para una evaluación más objetiva del desempeño, y compensación monetaria.

La capacitación cruzada que permite la rotación de los miembros del personal dentro de muchos departamentos, es otra opción para el escalafón de carreras. La capacitación cruzada sirve para liberar de la monotonía que vive un analista especializado al realizar la misma función de trabajo día tras día. La capacitación cruzada puede ampliar y agudizar las habilidades de los trabajadores, permitiendo a los miembros del personal trabajar con diferentes personas y desarrollar un mejor entendimiento de la operación global del laboratorio. En algunos laboratorios, el entrenamiento cruzado puede ser una necesidad, proveyendo una mayor flexibilidad en el personal, de tal modo que el laboratorio pueda cumplir con las demandas del servicio. El especialista de una determinada área puede promover entrenamiento continuo y competente a los nuevos miembros del personal. Sin embargo, la especialización puede causar problemas de personal debido a la disminución en la flexibilidad.

Administración De Los Recursos

El director del laboratorio es el responsable de administrar los recursos del laboratorio, incluyendo al personal, reactivos, abastecimientos, y capital para equipos. Usando estos recursos, el laboratorio debe proveer los servicios que se esperan del mismo, como lo define el plan estratégico del hospital. El papel del laboratorio se desarrolla durante las discusiones con los usuarios que expresan sus necesidades y lo que esperan de este servicio. Así como el servicio que debe ser provisto, por quién, con qué frecuencia, a qué costo, y a partir de cuando entra en efecto el acuerdo.

Es una función del director aceptar el plan estratégico en nombre del laboratorio y usar todos los recursos del mismo para cubrir completamente las metas del plan. Un director competente motiva y refuerza al personal del laboratorio para planear e implementar las tareas necesarias para alcanzar las metas del plan estratégico. Por lo tanto, el director debe promover una atmósfera de libertad y creatividad donde el empleado involucrado sea valorado.

Además de introducir nuevas pruebas de diagnóstico para mantener el nivel del servicio en los más altos estándares posibles, cuando sea apropiado, el director buscará nuevos negocios para el laboratorio. Si los consigue, el director debe motivar al personal para que éste comprenda el interés profesional de estas oportunidades.

Desde el punto de vista práctico, la administración de recursos es usada para llevar a cabo la operación diaria del laboratorio. Para manejar estas responsabilidades exitosamente, el director prepara una agenda con un plan para ser ejecutado a corto plazo (operación diaria del laboratorio) y otra agenda para el plan a largo plazo (plan estratégico), el cual establece metas para los próximos 5 años.

Los recursos deben ser distribuidos con base a los datos actuales, los datos históricos y



las predicciones a cerca de los efectos de las tendencias actuales relacionadas con la operación del laboratorio. En el plazo corto, los incrementos repentinos en la carga de trabajo pueden ser solucionados si el laboratorio tiene el equipo con la capacidad para manejar mayor volumen o equipo de apoyo y personal con entrenamiento cruzado. El uso de tiempo extra, la redistribución del trabajo a otra estación, o el envío de poco volumen de pruebas a un laboratorio de referencia, también puede ayudar. Otra opción es trasladar trabajo a otro turno que tenga la capacidad de realizar la carga extra. Si la tendencia de incremento en la carga de trabajo se refleja en la carga rutinaria, se deben tomar las medidas apropiadas para aumentar personal, reactivos, abastecimientos, y equipo si es necesario. Si la carga de trabajo decrece repentinamente, pueden cerrarse estaciones de trabajo o consolidar las estaciones que tengan capacidad de manejar trabajo adicional. Además, se puede alentar a los miembros del personal del laboratorio que haga uso de sus vacaciones, que tome sus días libres designados, o que trabaje menos horas.

El plan a largo plazo está relacionado con la operación del laboratorio en un año o más en el futuro. El director debe seguir muy de cerca la operación diaria del laboratorio, predecir los efectos de las tendencias actuales sobre la operación del laboratorio en el futuro. Específicamente, el efecto de los cambios proyectados en el volumen de muestras, la mezcla de las pruebas en el personal, reactivos, abastecimientos, y equipo, deben ser evaluados para que las demandas del futuro servicio puedan ser cubiertas en forma adecuada. Al planear para el futuro, se deben considerar los siguientes factores significativos: La posibilidad de nuevas regulaciones gubernamentales, la oportunidad de reembolso, la necesidad de control del costo, la existencia de mercado para los servicios del laboratorio, satisfacción del cliente, satisfacción del empleado, y la competencia existente. Por otra parte, el director del laboratorio debe estar enterado de los avances tecnológicos que pueden incrementar la productividad del laboratorio.

Es crucial que el director comunique regularmente al personal acerca de los cambios que influyen fuertemente la operación diaria del laboratorio y acerca de los cambios que pueden afectar el laboratorio en el futuro. Es importante que todos los miembros del personal participen en el proceso de planeación provisional o final para acomodar esos cambios.

Administración Financiera

Presupuesto

El director del laboratorio tiene la responsabilidad de preparar el presupuesto del laboratorio para asegurar la operación de éste dentro de lo presupuestado. Los supervisores y jefes de sección deberían participar en la preparación del presupuesto al hacerse responsables del presupuesto de su respectiva sección.

El presupuesto es preparado usando cifras reales de los gastos operativos corrientes, ganancias, utilización de datos, y demografía de pacientes. Cualquier factor que pueda tener un efecto material en la operación financiera del laboratorio durante el presupuesto actual y el de los siguientes años, se toma en cuenta cuando se planea el presupuesto. Entre más grande sea el nivel de servicio demandado, mayores serán los gastos básicos de operación, porque será necesarios más personal, reactivos, y equipo. Deben considerarse incrementos en los



gastos básicos cuando se analicen las ganancias por el incremento de pruebas. Una vez que el presupuesto ha sido aprobado por la administración, éste es verificado por el director del laboratorio para asegurar que todas las provisiones sean exactas. La verificación real del presupuesto puede ser hecha por aquellos que están más familiarizados con cada componente de la operación en el laboratorio. Los documentos de apoyo que fueron usados para preparar el presupuesto también se usan para este proceso.

La presentación del presupuesto debe ser fácil de leer y entender, de tal modo que pueda ser monitoreado para identificar e investigar rápidamente variaciones más allá de los límites establecidos. Los gastos, ganancias, y la utilización de líneas de artículos por cada unidad de laboratorio debe ser definida individualmente para facilitar su monitoreo y asegurar que se está respetando lo presupuestado. La línea de artículos para cada unidad financiera y operacional del laboratorio, puede incluir mano de obra y prestaciones, surtido de artículos para las pruebas, artículos que no se usan en las pruebas, reactivos, contratos de renta o préstamo de equipos, contratos de servicios, reparaciones y mantenimiento, pago de pruebas enviadas a otros laboratorios, utilización individual de cada prueba, otros cargos a pacientes externos/internos, ganancias (colectados ya sea liquidadas totalmente o parcialmente), y el balance negativo.

Los registros utilizados para preparar el presupuesto en vigencia deben ser retenidos con el propósito de poder investigar rápidamente las variaciones que se presenten en cada línea. Es importante hacer reportes mensuales para comparar el desempeño actual de cada unidad con el que se proyectó en el presupuesto. El laboratorio debe establecer criterios para investigar las variaciones del presupuesto. Las explicaciones de la variación inaceptable en los gastos de una línea de artículos, deben describir la variación como una tendencia, una fluctuación al azar, o un cambio real causado por cambios en la periodicidad de las órdenes o en los patrones de pago, cambios en carga de trabajo, problemas relacionados con el personal, o cambios operacionales. La explicación debe incluir cualquier acción correctiva que se siga. Las notas guardadas durante la investigación de las acciones correctivas serán de gran ayuda para la preparación del próximo presupuesto.

Pueden usarse comparaciones entre el desempeño del presupuesto de un año a la fecha, con ambos, el presupuesto que se predijo y el presupuesto del año pasado, para mostrar tendencias en una línea específica de artículos. Estas tendencias a veces pueden ser vistas sólo con el presupuesto en un artículo particularmente y no en el presupuesto entero del laboratorio. El estudio de las comparaciones mensuales y las de un año a la fecha permiten al director del laboratorio revisar la variación específica de cada unidad y seguir una acción correctiva para ajustar el presupuesto de una unidad o del laboratorio total. El entendimiento de estas variaciones del presupuesto permitirá al director preparar futuros presupuestos que reflejen aspectos de las ganancias y gastos con más exactitud.

Justificación del capital

La mayoría de los laboratorios requieren justificar el capital de las compras por una sola vez con costo por arriba de una cierta cantidad, por ejemplo \$ 500. El grado de los detalles requeridos para justificar una compra, puede variar según el costo de la misma. Si el equipo es comprado para pruebas de laboratorio, entonces la justificación debe detallar claramente el costo del artículo, la instalación, abastecimientos, reactivos, controles,



estándares, y contrato de servicio. El director calcula el costo por resultado reportable, tomado en cuenta el tamaño y frecuencia de las corridas, frecuencia de calibraciones, ya sea que el equipo será usado para pruebas de urgencias o pruebas de rutina o ambas, si las muestras se analizarán una vez o por duplicado, se incluye también el número analizado de controles, estándares, y muestras repetidas en una corrida. El costo de la mano de obra por prueba, debe ser calculado exactamente. Finalmente, una comparación financiera y operacional del método propuesto con el método existente debe mostrar menor costo y una justificación sustancial del capital.

Cuando se adquiere una pieza o instrumento capital, es deseable una máxima flexibilidad para obtener un instrumento de “tecnología moderna”, mediante la disminución del período del tiempo que el laboratorio es obligado a utilizar un instrumento específico. Por lo tanto, el director del laboratorio debe evaluar cuidadosamente el costo de compra, arrendamiento, renta o el costo de las rentas de reactivos de un instrumento. Cuando un instrumento es adquirido a través del plan de renta de reactivos, al laboratorio le cobran los reactivos (el vendedor incluye el precio del equipo en el costo de los reactivos) a un precio previamente acordado. El laboratorio hace el contrato para la compra de una cantidad mínima de material para las pruebas, basado en las necesidades actuales y futuras. La Tabla 2-4 compara los costos de renta de reactivos con los costos de compras directas. El tipo de decisiones de compra descrito en la Tabla 2-4 está basado en el flujo de efectivo. Si no hay capital disponible, se puede adquirir el equipo por renta de reactivos. Sin embargo, la compra de equipo usando el programa de renta de reactivos resulta más costosa que la compra directa. Esto es porque el hospital normalmente obtiene el reembolso por el Medicare y otros pagos con base al capital gastado. Si se usa la renta de reactivos, no hay reembolso de capital. Si se usa el flujo de efectivo, entonces se puede usar un arrendamiento. Por este medio, el costo mensual es cargado junto con el costo de reactivos. Este costo capital generalmente se puede someter para reembolso.

A veces los fabricantes ofrecen incentivos adicionales cuando más de una unidad es obtenida. Como se dijo antes, es necesario realizar un análisis de costos para cada prueba que está siendo considerada y preparar una declaración en una proforma financiera del equipo que se pretende adquirir. También debe tomarse en cuenta el costo de la evaluación, y el establecimiento del método de adquisición escogido debe tomarse en cuenta. En todos los casos, el análisis de costos y la proforma financiera deben estar claramente escritos y documentados con todos los datos que lo apoyen, anexos al reporte escrito. También se incluye una copia del contrato con el fabricante.

Compras

Los abastecimientos, reactivos, y equipo son comprados con fondos asignados al presupuesto del departamento. Para estar dentro del presupuesto, el director del laboratorio, el personal y el departamento de compras deben trabajar en equipo para asegurar los precios más bajos por parte de los vendedores, contratistas nacionales y varios grupos compradores. Antes de tomar la decisión de ordenar una compra se debe evaluar el precio, localización de los centros de distribución, disponibilidad de los productos, y servicios de atención al cliente por parte de las empresas comerciales. Puede ser necesaria la compra de un reactivo específico o material más caro en lugar del artículo genérico de menor precio, con el propósito



de tener la certeza en la exactitud de los resultados y en la función adecuada de los sistemas de prueba. El departamento de compras tiene que ayudar en la negociación de descuentos por mayoreo y en la obtención de los mismos números de lote por un largo tiempo para alargar más la consistencia en los resultados. El CLIA '88 estipula (493.1218) la obligación de verificar los nuevos lotes de reactivo o aún nuevos envíos del mismo lote, para su utilidad.

Uno de los mayores problemas que enfrentan los hospitales es el flujo de efectivo, es decir, la suficiente colección de fondos para pagar a tiempo sus gastos. Por esta razón, las opciones alternativas de compras se han vuelto comunes en el marco del laboratorio. Sin embargo, al hacer estas transacciones es importante tomar en consideración el costo del préstamo.

Contabilidad de costos

La contabilidad de costos es un método por medio del cual todos los costos asociados con la producción y adquisición de un artículo particular son identificados. En el laboratorio clínico, esto se aplica primordialmente al cálculo del costo por resultado de prueba reportable. Entre más detallado y completo sea el análisis, más exacta y útil será la determinación del costo. La Tabla 2-5 propone una lista de costos para ser incluidos en el análisis. El uso de un análisis completo, puede descubrir factores de costo que estaban bloqueados y que tienen un impacto significativo en el cálculo del costo real por resultado reportable. Resulta ventajosa la comprensión de cuáles factores tienen el mayor efecto en los costos de las pruebas y cuáles son los factores que son afectados por el equipo o la metodología, dentro del propio laboratorio. Este tipo de análisis también ofrece ventajas al comparar un nuevo método o procedimiento de prueba contra uno existente, para calcular con mayor exactitud el costo real por resultado reportable. La meta final de la contabilidad de costos es la determinación del costo real de la prueba. Esto le permite al director del laboratorio ofrecer mejores precios en un lugar con mercado competitivo. La manera más simple para realizar la contabilidad de costos es usar un paquete (software), como el SUMIT™ el cual ha sido designado específicamente para la contabilidad de costos del laboratorio.

Revisión general de los aspectos de reembolsos

Los reembolsos en un ambiente hospitalario se refieren al proceso por el cual se reciben los pagos por parte de instituciones como Medicare y Medicaid, compañías aseguradoras privadas, Organizaciones Médicas de Salud (“Health Medical Organizations” o “HMO” en inglés), y pacientes. Los cobros a los pacientes privados o particulares es la entrada más pequeña en la mayor parte de las instituciones y estos pacientes son el único grupo que paga la cantidad completa de su cuenta. La mayoría de los otros clientes negocian tarifas de descuentos con el hospital o con el laboratorio. El Medicare paga una tarifa básica por diagnóstico. Esta tarifa básica está basada en el sistema llamado DGR (Diagnosis Related Group). Este pago básico es fijo para cada enfermedad diagnosticada y cubre todos los servicios a pacientes hospitalizados, incluyendo pruebas de laboratorio realizadas durante la estancia del paciente en el hospital.

El reembolso por Medicare está dividido en dos categorías: Parte A y Parte B. Es decir que, la Parte A hace los pagos por servicios de pacientes hospitalizados, mientras que la



Parte B hace los pagos por los servicios médicos y pruebas de laboratorio en pacientes externos. Si las pruebas de laboratorio de un paciente son realizadas dentro de las 72 horas de su admisión, entonces los hospitales deben solicitar su inclusión para cobertura bajo el pago por DRG en lugar de cobrarlos por separado. El reembolso de todas las pruebas de pacientes externos se hacen de acuerdo a un número de código. Estos números, llamados Terminología Común de Procedimientos ("Common Procedure Terminology" o "CPT", en inglés), son constantemente actualizados y modificados. El laboratorio debe tener una copia actualizada de los códigos de cobro.

El Medicare generalmente reembolsa a los hospitales algunos gastos capitales usando una fórmula basada en los gastos. El Medicare, sin embargo, tiene un plan progresivo que hará un pago fijo por capital gastado de cada paciente tratado que tenga Medicare. Este nuevo plan de reembolso produce en el laboratorio el efecto de forzarlo a trabajar más como un negocio. El reembolso se basará en un pago con capital de aproximadamente \$400 por paciente dado de alta. Menos pacientes significa que hay menos dinero disponible para gastos de capital. También, si un hospital no hace una compra con capital, de todas formas recibe el mismo dinero. Esta póliza puede conducir a los laboratorios a retener el equipo por períodos de tiempo más largos. Entonces el reembolso puede ser contabilizado como ganancia. Este plan, sin embargo, puede retrasar a una institución en la adquisición de nuevo equipo de alta eficiencia, que resulta necesario para mantener la competitividad.

Manejo de la Información

El Capítulo 18, Sistemas de Información del Laboratorio, SIL ("Laboratory Information Services o "LIS", en inglés), revisa el uso de un SIL para manejar la información e incrementar la productividad del laboratorio. Para manejar la información se usan algunas herramientas tales como los reportes financieros y de utilización generados por el SIL. La Tabla 2-6 enumera varios de los reportes de utilización que deben ser revisados en forma rutinaria por el director del laboratorio. Las listas de reportes de producción del trabajo pueden ser encontradas en la pág. 332 capítulo 18.

Al preparar un sistema de administración para evaluar el desempeño del laboratorio, es importante que el sistema incluya monitoreos en los cuatro aspectos de operación. Estos incluyen:

- Desempeño Financiero
- Productividad
- Utilización
- Tiempo de Entrega de Resultados

La siguiente sección resume brevemente muchos indicadores claves para cada aspecto de las operaciones. El sistema de monitoreo debe evaluar cada sección individualmente (por ejemplo, química, hematología, y microbiología) y al laboratorio como un todo.

Desempeño financiero

Los reportes financieros del SIL deben proveer información exacta, detallada, y



actualizada de los gastos reales del laboratorio comparados con aquellos planeados en el presupuesto. Sin embargo, estos reportes financieros no le informan al director que tan bien se está desempeñando el laboratorio, comparado con otros en hospitales de similar tamaño, agudeza, localización, y nivel de servicio. La subscripción a un sistema de base de datos como el LABTRENDS* permite hacer tal comparación. Las comparaciones pueden hacerse en áreas específicas del laboratorio y se pueden evaluar diferencias significativas para tomar medidas correctivas que mejoren la productividad, gastos o ganancias.

El costo promedio por prueba realizada es una medida excepcionalmente importante del desempeño de la operación. Ya que la mano de obra y los abastecimientos constituyen alrededor del 70% al 75% del presupuesto de la mayoría de los laboratorios (incluyendo prestaciones de los empleados, gastos de depreciación, y compensación a patólogos), es importante monitorear estos elementos de costos del laboratorio. Las reparaciones, mantenimiento preventivo, y pruebas de referencia a otros laboratorios generalmente representan del 3% al 10% del presupuesto de la mayoría de los laboratorios. Los monitores de estos costos se muestran en el cuadro abajo.

Monitores de Desempeño Financiero
Costo/Por prueba realizada en el laboratorio
Gastos de Compensación y Prestaciones/ Prueba Realizada
Gastos de Compensación y Prestaciones/ Hora
Gastos de Abastecimientos/ Prueba Realizada
Costo/ Prueba Referida
Gastos de Reparaciones y Mantenimiento Preventivo/ Prueba Realizada
Compensación a Patólogos como Porcentaje del Gasto Total del Laboratorio

Productividad

La medición de la productividad general del laboratorio y de cada una de las secciones, debe ser parte del desempeño de cualquier sistema operacional desarrollado. La revisión de la productividad debe incluir los siguientes monitores:

- Número de pruebas realizadas/Personal de tiempo completo (FTE)
para la realización de las pruebas (incluyendo el tiempo del supervisor) (asignado a una estación específica de trabajo)
- Número de pruebas realizadas/ total del personal de tiempo completo
- Número de pruebas realizadas/ hora trabajada
- Horas trabajadas como porcentaje de horas pagadas

En el pasado, los laboratorios usaban las unidades de carga de trabajo del CAP como un indicador de productividad. Estas unidades asignaban un cierto número de unidades de trabajo para cada procedimiento de laboratorio basado en el tiempo requerido para realizar el procedimiento. Los laboratorios podían entonces comparar sus valores de productividad actual con un número calculado, basado en los procedimientos que ellos realizaron. Sin



embargo, estos números fueron resultando irreales y en 1992 el CAP discontinuó su plan de carga de trabajo. Éste ha sido reemplazado por un sistema que usa algunos de los parámetros enumerados arriba.

El uso de los parámetros de arriba y la comparación del laboratorio con una base de datos como LABTRENDS™ o el programa del CAP; el LMIP™, permite al director del laboratorio ver que tan eficiente es su laboratorio comparado con otros laboratorios similares. Esta comparación puede entonces ser usada para ayudar a justificar personal adicional si el laboratorio está operando con personal insuficiente (productividad más alta que la promedio), comparado con la media de la base de datos de comparación.

Utilización de las pruebas

Es ampliamente aceptado que la utilización que el personal médico hace que las pruebas de laboratorio, varíen significativamente de hospital a hospital y no está manejado exclusivamente por la agudeza (medida indicadora de la gravedad del paciente) o demandas de los pacientes. La utilización de las pruebas de laboratorio en los hospitales con pacientes internados con similares agudezas o programas (por ejemplo, transplante de órganos o SIDA, etc.), tiene diferencias sustanciales en el índice de utilización del laboratorio. Los sistemas que son usados para el monitoreo del desempeño operacional incluyen la utilización de indicadores clave mostrados abajo.

Número de pruebas realizadas en pacientes hospitalizados/paciente por día.

Número de pruebas realizadas en pacientes hospitalizados/pacientes dados de alta.

Algunos hospitales pueden realizar una revisión de la utilización de pruebas para ciertas áreas o médicos individuales, como un intento de controlar la sobreutilización de los recursos del laboratorio.

Tiempo de entrega de resultados

Una revisión estadística de los tiempos de entrega de resultados ("Turnaround Time" o "TAT", en inglés) puede ayudar al director del laboratorio a entender y evaluar mejor el desempeño operacional. Ya que las demandas del servicio pueden afectar grandemente los patrones del personal, instrumentación determinada, y costos de mano de obra, es importante medir los TATs reales para determinar si se están cumpliendo los TATs que el personal médico del hospital espera. El sistema de monitoreo de los TATs debe incluir entre 20 y 30 pruebas de las más comúnmente realizadas en el laboratorio, también como aquellas pruebas que requirieren un TAT especialmente corto (por ejemplo, pruebas de urgencia y pruebas de embarazo).

Hay varias formas de monitorear los TATs por nombre de prueba. Una metodología común identifica y sigue la distribución de los TATs basados en el tiempo transcurrido desde que la prueba fue ordenada hasta que se entregó el resultado. Es también importante evaluar tres diferentes etapas de los TATs: la fase preanalítica, analítica, y postanalítica. Para monitorear los TATs de esta manera, el software del SIL necesita identificar la hora de



colección de la muestra, la hora a la que el laboratorio tuvo acceso a la muestra, y la hora a la que el médico recibió el resultado.

Mejoramiento Continuo de la Calidad

El Mejoramiento Continuo de la Calidad ("Continuous Quality Improvement" o "CQI", en inglés) es un proceso que usa el laboratorio para asegurar que el resultado correcto es reportado para el paciente correspondiente en un tiempo oportuno. Estos procesos han sido requeridos por la JCAHO por algún tiempo. Recientemente ha sido ordenado por la HCFA en la legislación de la CLIA '88. Este proceso involucra los indicadores de la evaluación del aseguramiento de la calidad ("AC") que monitorean el nivel de desempeño en el laboratorio. Una meta de desempeño se realiza, si después del monitoreo, algún indicador sugiere que el desempeño no cumple con lo establecido. Entonces debe tomarse una acción correctiva para superar la deficiencia. Para saber si el problema ha sido corregido, es necesario monitorear nuevamente el mismo indicador. Si no, se pondrá en función un nuevo plan hasta que el desempeño del indicador sea satisfactorio. El ejemplo de una forma de monitoreo del desempeño está mostrado en la Fig. 2-6.

En la preparación de un programa del aseguramiento de la calidad se debe establecer una meta. Un ejemplo, como se describe en la Fig. 2-6, sería "monitorear, evaluar y mejorar, si es necesario, el TAT de urgencias de los análisis de HCG." Después de haber decidido una meta junto con el director del laboratorio, se debe establecer un comité representativo del AC (Aseguramiento de la Calidad). Este comité estará compuesto por un representante de cada sección del laboratorio. El director del laboratorio debe estar involucrado en el proceso del mejoramiento continuo de la calidad para que éste sea efectivo. El comité debe establecer los parámetros que serán monitoreados así como los valores indicados para un indicador determinado.

Los monitoreos pueden variar debido a las características individuales de cada operación en los diferentes laboratorios, pero la CLIA '88 demanda que sean evaluados, como mínimo, los índices mostrados en la sección "Aseguramiento de la Calidad de los Monitores." Se recomienda al lector obtener copias del Registro Federal del 2/28/92 y 1/19/93 para una descripción completa del proceso de AC de la CLIA '88, subdivisión P 493.1701-493.1721.

Monitores de aseguramiento de la calidad

1. Administración de las pruebas de pacientes

Basado en los resultados de sus evaluaciones, el laboratorio debe monitorear, evaluar, y revisar, si es necesario, lo siguiente:

- a. El criterio establecido para la preparación del paciente, colección, etiquetado, conservación, y transportación de las muestras;
- b. La información solicitada y obtenida en las solicitudes de pruebas de laboratorio para determinar si está completa, su relación con la información y la necesidad de realizar las pruebas en la muestra del paciente;
- c. El uso apropiado del criterio establecido para el rechazo de muestras;
- d. El llenado, utilidad y exactitud de la información reportada de la prueba que es



necesaria para la utilización e interpretación de los resultados;

- e. El tiempo del reporte de los resultados basado en la prioridad de las pruebas (urgencias, rutina, etc.); y
- f. La exactitud y confiabilidad de los sistemas de reporte, apropiado almacenamiento de los registros y recuperación de resultados de las pruebas.

2. *Evaluación del CC*

El laboratorio debe tener un mecanismo continuo para evaluar las acciones correctivas tomadas bajo "Acciones de Remedio": 493.1219. Los procedimientos y políticas no efectivos, deben ser revisadas con base al resultado de la evaluación. El mecanismo debe evaluar y revisar la efectividad de las acciones correctivas tomada para:

- a. Problemas identificados durante la evaluación de la calibración y control de datos de cada método de prueba;
- b. Problemas identificados durante la evaluación de los valores de las pruebas de los pacientes con el propósito de verificar los intervalos de referencia del método de una prueba; y
- c. Errores detectados en resultados reportados.

3. *Valoración del control externo de la calidad*

En la subdivisión H de esta división, del Control Externo de la Calidad, se debe evaluar la efectividad de las medidas correctivas que se tomaron para remediar los resultados insatisfactorios, inaceptables o no exitosos.

4. *Comparación de resultados de pruebas*

- a. Si el laboratorio realiza la misma prueba usando diferentes metodologías o instrumentos, o realiza la misma prueba en diferentes sitios, éste debe contar con un sistema semestral que evalúe y defina la relación entre los resultados de pruebas provenientes de diferentes metodologías, instrumentos, o sitios de prueba.
- b. Si el laboratorio realiza pruebas que no están incluidas en la subdivisión I de esta división, de los Programas de Control Externo de la Calidad, éste debe contar con un sistema de verificación de la exactitud de sus resultados al menos dos veces por año.

5. *Relación entre la información del paciente y sus resultados*

Para el Aseguramiento de la Calidad interno ("Quality Assurance" o "QA", en inglés), el laboratorio debe tener un mecanismo para identificar y evaluar los resultados de las pruebas de los pacientes que parecen ser inconsistentes con el criterio clínico del paciente, tales como:

- a. Edad del Paciente;
- b. Sexo;
- c. Diagnóstico o datos clínicos pertinentes, cuando sean provistos;
- d. Distribución de los resultados de pacientes, cuando estén disponibles; y
- e. Relación con otros parámetros de prueba, cuando estén disponibles dentro del laboratorio.

6. *Evaluación del personal*

El laboratorio debe tener un mecanismo continuo para evaluar la efectividad de sus políticas y procedimientos para asegurar la competencia de sus empleados y, si es aplicable, la competencia de sus especialistas.

7. *Comunicaciones*

El laboratorio debe contar con un sistema para la documentación de problemas que



ocurren como resultado de falta de comunicación entre el laboratorio y el individuo autorizado, que ordena o recibe los resultados de los procedimientos de las pruebas o exámenes. Cuando sea necesario deben tomarse medidas correctivas para resolver y minimizar los problemas de falta de comunicación.

8. *Investigación de quejas*

El laboratorio debe tener un sistema que asegure que todas las quejas o problemas reportados al mismo sean documentados. La investigación de las quejas deben hacerse cuando se hayan instituido las acciones correctivas apropiadas.

9. *Revisión del aseguramiento de la calidad ("AC") con el personal*

El laboratorio debe tener un mecanismo de documentación y valoración de los problemas identificados durante las revisiones del aseguramiento de la calidad y debe discutirlos con el personal. Es importante que el laboratorio tome las medidas correctivas necesarias para evitar recurrencias.

10. *Estándares; registro del aseguramiento de la calidad (AC)*

El laboratorio debe mantener la documentación de todas las actividades del AC incluyendo problemas identificados y medidas correctivas tomadas. Todos los registros del AC deben estar disponibles para el HHS y ser mantenidos por un período de 2 años.

Después de establecer los monitoreos, el comité debe decidir con que frecuencia serán examinados. Algunos, como los TATs pueden ser evaluados mensualmente hasta que el tiempo esperado se cumpla repetidamente. Otros, seguirán diferentes programaciones. Por ejemplo, la documentación del control externo de la calidad se puede monitorear cada cuatro meses cuando el laboratorio realice dichas pruebas. El proceso de mejoramiento continuo de la calidad ("CQI") es esencial, pero consume mucho tiempo, por lo que el comité debe balancear la necesidad de monitorear el CQI contra el hecho de que el laboratorio debe cumplir con una carga diaria de trabajo.

Después de evaluar los monitores, el comité debe formular un plan para mejorar aquellos monitores que no cumplen con lo esperado. Después de poner en marcha un nuevo proceso se inicia otra vez un monitoreo. Es importante revisar los resultados de AC con el personal para asegurar su introducción.

Referencias

Managing Director, World Wide Health Care Consulting, Surprise, AZ, Director of Chemistry Columbus Hospital Chicago, IL
Clinical Laboratory Consultant, World Wide Health Care Consulting, Surprise, AZ, Microbiology Consultant, LaGrange Memorial Hospital LaGrange, IL.
Manager of Laboratory Services, LaGrange Memorial Hospital, LaGrange, IL.
Laboratory Administrative Director, Alexian Brothers Medical Center, Elkgrove Village, IL.

General

Davidson, J.P.: Are you entrepreneurial material? *Clin Lab Manage Rev* 4(3):192- 195, 1990.

Fritz, R.: I'm your new boss . . . why are you laughing? *Clin Lab Manage Rev* 6(2): 162-163, 1992.



Regulaciones

Federal Register, 56(235): 64175-64182, December 6, 1991.

Federal Register, 57(40): 7001-7186, February 28, 1992.

Federal Register, 58(11): 5211-5237, January 19, 1993.

Federal Register, 58(139): 39154-39156, July 22, 1993.

Administración de la estructura hospitalaria y administración de la comunicación

Haynes, M.E.: How to conduct quality meetings, *CLMR*, 4(1):29-36, 1990.

Hunt, L.B.: Here's how you can harness the positive energy of conflict, *CLMR*, 6(5):456-459, 1992.

Ketchum, S.M.: Overcoming the four toughest management challenges, *CLMR*, 5(4):246-263, 1991.

Lussier, R.N.: Assigning tasks effectively using a model, *CLMR*, 6(2):150-153, 1992.

Miner, F.C.: If two heads are better than one, why do I have bruises on my forehead?, *CLMR*, 5(5):386-393, 1991.

Pfeiffer, I.L., and Dunlap, J.B.: Empowered employees--a good personnel investment, *CLMR*, 6(2):154-161, 1992.

Rinke, W.J.: Establishing a shared vision in your organization, *CLMR*, 3(2):95-99, 1989.

Veninga, R.L.: Crisis management: strategies for building morale in uncertain times, *CLMR*, 6(5):449-455, 1992.

Young, S.: Developing your political skills, *CLMR*, 3(2):100-102, 1989.

Baytos, L.M.: Launching successful diversity initiatives, *HR Magazine*, 37(3):91-97, 1992.

Administración del personal

Comer, D.R.: Improving group productivity by reducing individual loafing, *CLMR*, 6(3):232-235, 1992.

Dawson, K.M., and Dawson, S.N.: The cure for employee malaise--motivation, *CLMR*, 5(4):296-302, 1991.

Fritz, R.: How to keep your best people for the '90s, *CLMR*, 4(4):306-310, 1990.

Petrack, J.A., and Manning, G.E.: Work morale and assessment and development for the clinical laboratory manager, *CLMR*, 6(2):141-149, 1992.

Surber, J.A., and Wallhermfechtel, M.: A comprehensive career ladder for the clinical laboratory, *CLMR*, 4(6):441-446, 1991.

Administración de recursos

Hinterhuber, H.H., and Popp, W.: Are you a strategist or just a manager? *Harvard Business Review*, 70(1):105-113, 1992.

Reeves, P.N.: Strategic planning for every manager, *CLMR*, 4(4):272-275, 1990.

Administración financiera

Brase, S.J., and Matysik, M.K.: Laboratory manager's financial handbook, *CLMR*, 6(2):164-169, 1992.

Carpenter, R.B.: Laboratory cost analysis: a practical approach, *CLMR*, 4(3):168-177, 1990.

Getzen, T.E.: Laboratory manager's financial handbook: What is value?, *CLMR*, 6(3):237-240, 1992.

Kisner, H.J.: Laboratory manager's financial handbook: expense management-supplies, *CLMR*, 6(4):341-348, 1992.

Melbin, J.E.: One for all, *MT Today*, December 7, 1992, 8-9.

Patterson, P.P.: Cost accounting in hospitals and clinical laboratories: Part II, *CLMR*, 3(1):26-33.

Portugal, B.: Factors influencing relative financial performance of hospital laboratories, *CLMR*, 3(2):81-87, 1989.

Administración de la información mejoramiento continuo de la calidad



Bull, G., Maffetone, M.A., and Miller, S.K.: As we see it: Implementing TQM, *CLMR*, 6(3):256-261, May/June, 1992.

Clark, G.B.: Quality assurance, an administrative means to a managerial end, *CLMR*, 6(5): Part I 4(1):7-17, 1990; Part II, 4(4):224-252, 1990; Part III, 5(6):463-475, 1991; Part IV, 6(5):426-440, 1992.

Westgard, J.O., Barry, P.L., and Tomar, R.H.: Implementing total quality management (TQM) in health-care laboratories, *CLMR*, 5(5):353-370. 1991.

Recursos generales

Lifshitz, M.S., and De Cresce, R.P.: Understanding, Selecting, and Acquiring Clinical Laboratory Analyzers, New York, 1986, Alan R. Liss, Inc.

Martin, B.G, editor: The CLMA Guide to Managing a Clinical Laboratory, Pennsylvania, 1991.

Rubenstein, N.M.: Handbook of Clinical Laboratory Management, Maryland, 1986, Aspen Publishers, Inc.

Sattler, J., and Smith, A.: A practical guide to financial management of the clinical laboratory, New Jersey, 1986, Medical Economics Books, 2nd edition.

Snyder, J.R., and Senhauser, D.A., editors: Administration and Supervision in Laboratory Medicine, Philadelphia, 1989, J.B. Lippencott, Co.

Tablas

Tabla 2-1 Lineamientos para guardar los registros de laboratorio

Tipo de registro	Tiempo de retención del registro (años)	Observación
General§		
Solicitudes de pruebas	2*	
Registros de pruebas	2†	
Reportes de pruebas	2†	Desde la fecha del reporte, de manera preliminar o final
Control de calidad	2†	
Manual de laboratorio para procedimientos de prueba	2*	Dos años después que la prueba es descontinuada
Registros de pruebas de competencia y de acciones de remediación	2*	
Mantenimiento del instrumento	Vida del instrumento†	
Personal	30†	
Laboratorio clínico		
Registro de ingreso y pruebas del paciente	2†	
Muestras	24 horas†	



Sustancias controladas	3†	
Radiounucleótidos	3†	
Sustancias peligrosas/ enfermedades infecciosas		
Capacitación de empleados	3‡	
Historia médica y de exposición de empleados	30‡	Treinta años después del empleo
Exposición a formaldehído y a benceno	30‡	
Registros de capacitación	3	Desde la fecha de capacitación
De: Passay R: Med Lab Observer, Feb, 1993. *Regulaciones de la CLIA '88. †Colegio de Patólogos Americanos. ‡Administración de Seguridad y Salud Ocupacional (OSHA). §La CLIA establece que los registros deben conservarse por tres años si el tiempo de retención no es mencionado específicamente en las regulaciones.		

Tabla 2- 2. Habilidades de administración y características personales deseables en los directores de laboratorio.

Analítico	Competente	Compasivo	Honrado
Comunicativo	Articulado	Proveedor de retroalimentación	Astucia financiera
Justo	Informado	Considerado	Entendido en SIL
Comprensivo	Político	Oyente	Organizado
Objetivo	Puntual	Responsable	Respetuoso
Exacto	Proveedor de liderazgo	Racional	Habilidad para delegar
Visionario	Con recursos	Crefble	Establecedor de metas

Tabla 2-3. Información útil para ser mantenida en el expediente de cada empleado.

- ♦cumplimiento de estándares
- ♦Solicitud de empleo incluyendo experiencia en el área
- ♦Educación y certificación pertinente
- ♦Nivel de Complejidad de Pruebas (CLIA"88) que el empleado puede realizar
- ♦Si el empleado requiere supervisión directa
- ♦Areas donde el empleado es competente
- ♦Evaluaciones periódicas para la competencia



- ♦ Registro de Educación Interna
- ♦ Registro de Entrenamiento en Medidas de Salud y Seguridad
- ♦ Asistencia a Cursos de Entrenamiento
- ♦ Registro de Vacunas tales como la de Hepatitis B, o una declaración por escrito del rechazo a recibirla
- ♦ CLIA, Clinical Laboratories Improvements Amendments

Tabla 2-4. Comparación entre compras directas* y renta de reactivos.

Compras directas	Renta de reactivos
Precio del Instrumento	$\text{Costo del reactivo/prueba}^{**,+} \times$
Pérdida del interés del dinero por 5 años	$\frac{\text{Volumen de pruebas/año} \times 5 \text{ años}}{\text{Costo total por 5 años}}$
Contrato de servicio por 4 años	
Costo del instrumento por 5 años	
Costo del instrumento por 5 años	
Costo del reactivo**/prueba \times Volumen de pruebas/año \times 5 años	
Costo Total por 5 años	
* añadir líneas individuales para sumar costos.	
** Incluir volumen de calibradores y controles.	
+ Asumir que el servicio está incluido por 5 años.	

Tabla 2-5. Costos directos sobre costos indirectos.

Costo directos	Costos Indirectos
Reactivos	Depreciación acumulada
Mano de obra	Hospital general
Costos de equipo	Laboratorio general
Costos de servicios	Gastos Contables
Colección de suministros	Gastos regulatorios
Suministros para las pruebas	Administración laboral
Material de control de calidad	Gastos de SIL
Depreciación	

Tabla 2-6. Ejemplos de reportes de administración de laboratorio provistos por un SIL.

Tipo de Reporte	Función	Frecuencia
Carga total de trabajo	Monitoreo adecuado del	Trimestral

	número total de personal del laboratorio. Monitoreo de tendencias de cargas de trabajo.	
Carga de trabajo por turno	Monitoreo adecuado del número de personal en cada turno.	Trimestral
Carga de trabajo por empleado	Monitoreo de la carga de trabajo por un analista; comparando productividad con otros en el mismo turno y entre otros turnos.	Trimestral
Control de calidad de rutina	Monitoreo de exactitud y precisión a corto tiempo.	Bimensual
Tiempo de entrega de resultados	Monitoreo de servicio adecuado	Mensual

Figuras

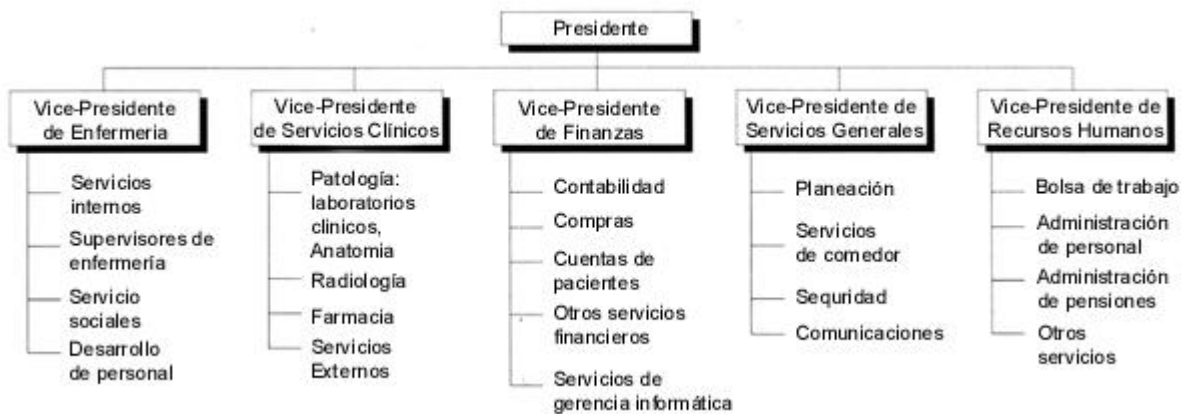


Fig. 2-1 Organigrama de la estructura de un hospital.

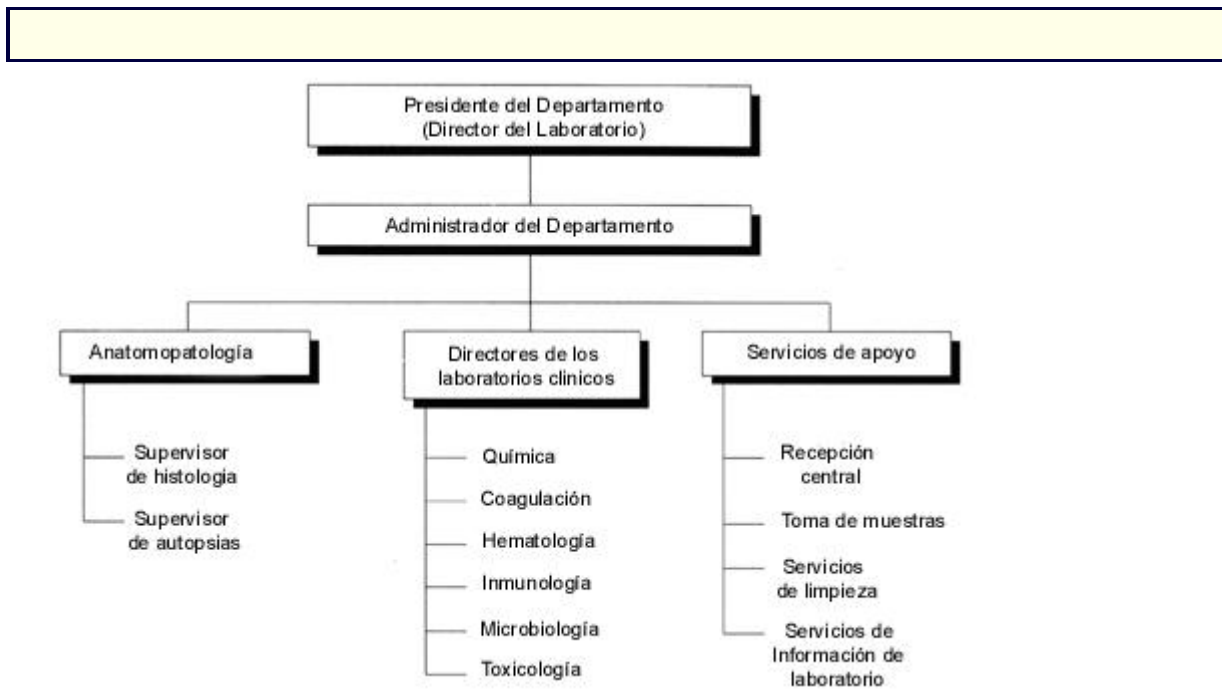


Figura 2-2 Organigrama de un departamento de patología.

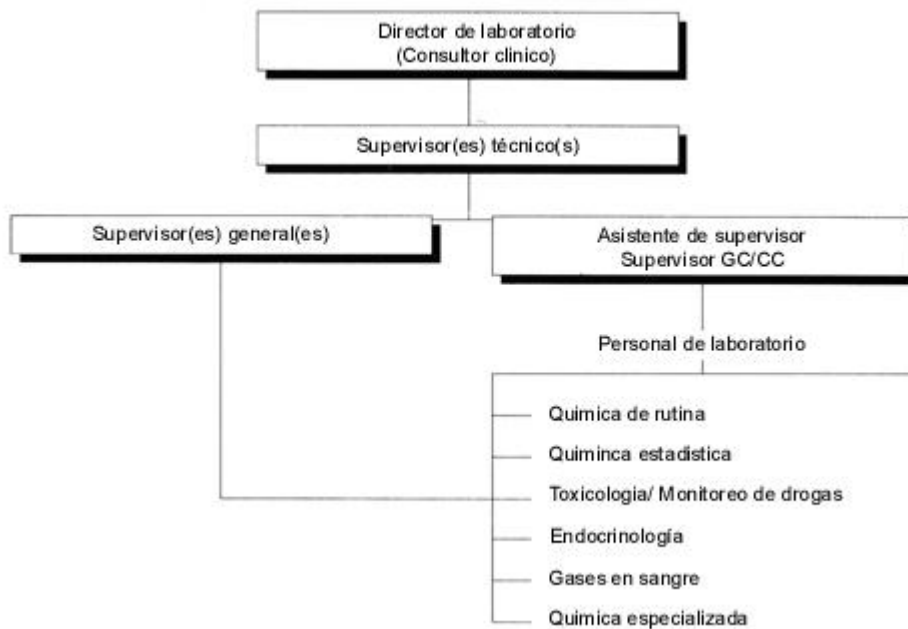


Figura 2-3 Organigrama de un laboratorio de química.

Replace table 2-4 below



**Personnel Qualifications
Laboratory Director
Moderate Complexity Testing
CFR 493.1443**

A qualified laboratory director must meet the requirements stated in one of the boxes below.

M.D. or D.O.
and
certified by
ABP or AOBP
or
M.D. or D.O. or D.P.M.
and 1 of the following:

- 2 years directing or supervising high-complexity testing
- 1 year of lab training during medical residency

Ph.D. in chemical, physical, biological, or clinical lab sciences and 1 of the following:

- Certified by ABMM, ABCC, ABB, or the ABMLI
- 1 year directing or supervising nonwaived lab testing

Be serving as a lab director and must have previously qualified or been eligible to qualify under 42CFR 493.1415 (published 1/14/90 at 55 FR 9538) on or before 2/28/92

or

On or before 2/28/92 be qualified under state law to direct a lab in the state in which the lab is located

This chart is a paraphrased and abridged version of the Code of Federal Regulations, Chapter 42, Section 493. Please consult the Code of Federal Regulations for exact wording. See Federal Register for job responsibilities and more detailed information.

M.D. or D.O. or D.P.M. always needs to be licensed in the state in which the lab is located.

State may require other degrees and experience to be licensed.

All degrees must be from an accredited institution.

Figura 2-4 Carta resumida de las calificaciones del personal requeridas por la CLIA '88 para un director de un laboratorio de complejidad moderada.

Replace Fig. 2-5 below

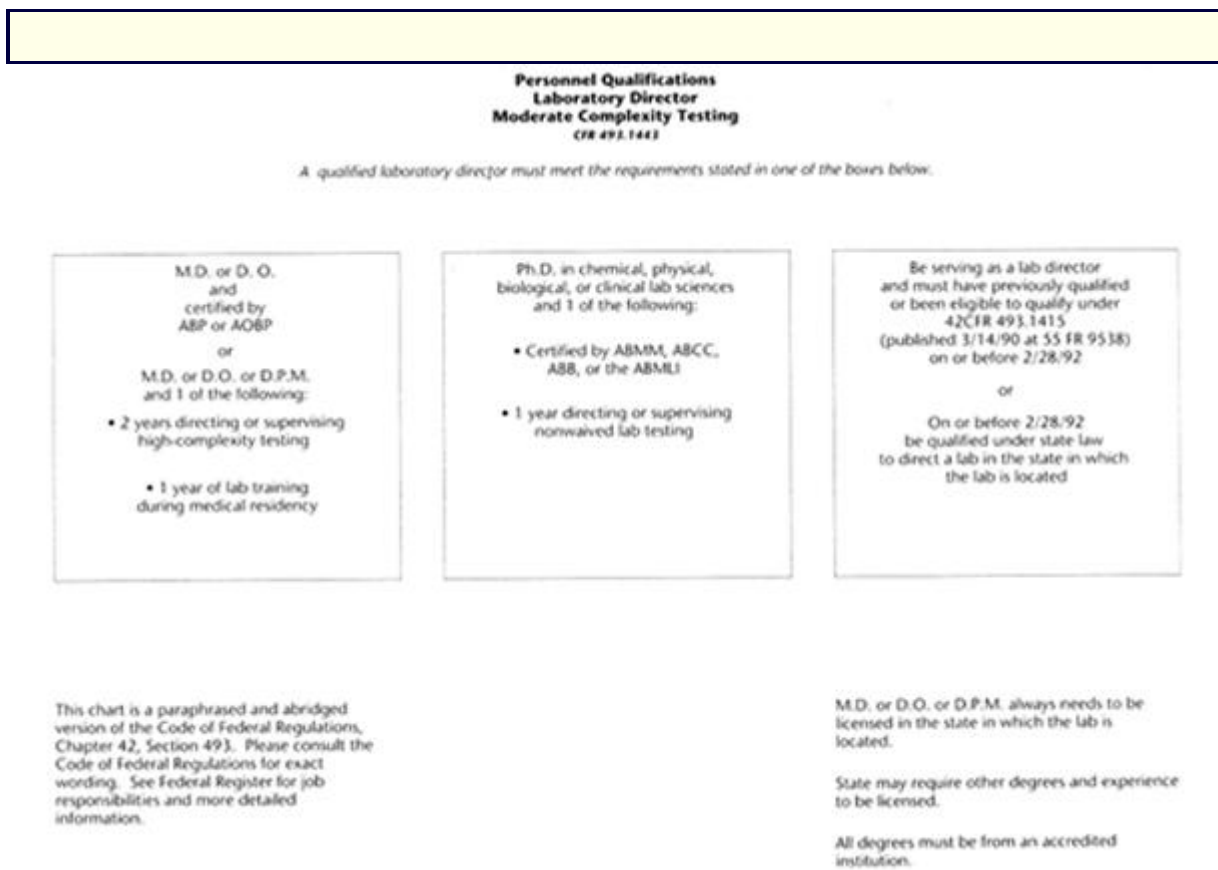
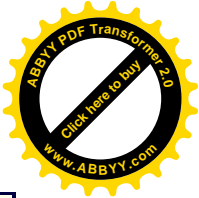


Figura 2-5 Carta resumida de las calificaciones del personal requeridas por la CLIA '88 para un director de un laboratorio de alta complejidad.

Reporte de Monitoreo del Aseguramiento de la Calidad.

Nombre de la Institución: Hospital Sunland

Nombre del Laboratorio o Sección: Químicas

Reporte del monitor de Aseguramiento de la Calidad, AC

Nombre de la prueba: Urgencias, pruebas de embarazo, suero

Monitor: Tiempo de Entrega de Resultados (Turnaround Time, TAT)

Criterio de evaluación y/o umbral:

95% de las pruebas séricas de embarazo de urgencias que se realizan dentro:

a: 30 minutos a partir de su recepción en el laboratorio

b: 90 minutos a partir de la hora de colecta

Período del monitoreo: Mensual, Anual : Julio, 1995 o

Trimestral: 1o 2o 3o 4o

Resultado del monitor: Cumple NO Cumple (subraye)

Datos del monitor:

a. 96.3% de todas las solicitudes son realizadas dentro de 30 minutos a partir



<p>de su recepción en el laboratorio</p> <p>b. 95.9% de todas las solicitudes son realizadas dentro de 90 minutos a partir de su colecta</p> <p>Revisión de acción: Hubo uno fuera de tiempo que fue realizado después de 2 horas de su colección. Muestra pérdida en áreas de recepción de muestras, se informó a la recepcionista</p> <p>Futuras acciones o comentarios: Tres muestras fuera del TATA (Tiempo de Entrega de Resultados) del laboratorio.</p> <p>Muestras recibidas en el laboratorio durante el período de la comida. Se comentará con el supervisor acerca de mantener la cobertura durante ese tiempos.</p> <p>Comparación con monitores previos: Dar % dentro de límites</p> <p>Anterior: _____ Dos anteriores: _____ :</p> <p>Fecha: _____ %: _____ Fecha: _____ %: _____</p> <p>Director del Laboratorio: _____</p> <p>Supervisor Técnico: _____</p>

Figura 2-6.. Forma para el monitoreo del aseguramiento de la calidad

CAPÍTULO 3

3. Fuentes y Control de la Variación Preanalítica

David R. Dufour

Causas de variación previas a la colecta

Variables de ciclos biológicos

Variables físicas relacionadas con el paciente

Procedimientos para minimizar las variables del paciente

Causas de variación en la colecta de sangre

Técnicas de colecta de sangre

Tipos de muestras de sangre

Errores relacionados con los preservativos y anticoagulantes

Errores relacionados con los tubos separadores de suero

Errores relacionados con las técnicas de colecta inadecuada

Errores relacionados con la identificación del paciente y la muestra correspondiente

Cadena de custodia

Procedimientos para minimizar la variación relacionada con la flebotomía

Causas de variación posterior a la colecta

Transporte de la muestra



Procesamiento de la muestra
Almacenamiento de la muestra

Otros aspectos preanalíticos de la colecta

Colecta de muestras de orina: fuentes de variación

Colecta de muestras en infantes

Ayuda del sistema de base de computación para la detección de errores.

Criterio de rechazo de muestras.

OBJETIVOS

- Describir las tres categorías mayores de variación preanalítica; bosquejar para cada categoría, los pasos que pueden ser tomados por los laboratorios para minimizar la variación.
- Describir las diferencias entre sangre capilar, venosa y arterial, al igual que las pruebas comunes de laboratorio que son afectadas en forma significativa por estas diferencias.
- Discutir el uso apropiado de los anticoagulantes y preservativos, y sus efectos en las pruebas comunes de laboratorio. Reconocer el patrón de contaminación del EDTA y sus causas.
- Categorizar los tipos de pruebas afectadas por la hemoconcentración, las causas de la hemoconcentración, y las técnicas de control para limitar su ocurrencia.
- Discutir la secuencia de los cambios ocurridos en especímenes después de su colecta, y las técnicas de control para limitar las alteraciones resultantes en la concentración del compuesto analizado.
- Definir que son las revisiones delta, y resumir su utilidad en la detección de errores analíticos.

Términos Clave

aditivo Sustancia química que al añadirse a una muestra causa uno o más cambios en sus propiedades físicas o químicas.

adsorber Acoplamiento de una sustancia química a una superficie sólida.

aerosol Una fina niebla producida por la atomización de un líquido.

alícuota Una pequeña parte de una determinada muestra, la cual tiene la misma composición química.

compuesto analizado Una sustancia que puede ser medida por una técnica analítica.

anastamosis Conexión de dos vasos sanguíneos.

anticoagulante Una sustancia que puede suprimir, retrasar, o evitar la coagulación de la sangre impidiendo la formación de fibrina.

antiséptico Una sustancia química la cual reduce el número de bacterias.

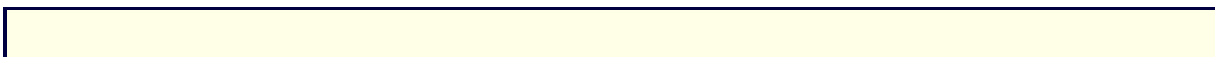
artefacto Cambio del estado de un material como resultado de un proceso o condición artificial más que de uno natural.

arterial Relacionado con o derivado de las arterias, los vasos que conducen sangre del corazón a los tejidos del cuerpo.

capilar Relacionado con un vaso sanguíneo muy delgado en los tejidos donde los nutrientes son depositados y los productos de desecho son removidos por la sangre.

catéter Un tubo de hule o plástico que conecta una cavidad del cuerpo con la superficie del cuerpo.

código de barras Un sistema que usa barras de anchos variables como una forma de proveer



información de identificación.

coágulo Agregación de células sanguíneas unidas por fibrina, una proteína polimerizada.

cronobiología La ciencia que estudia la variación cíclica de los organismos vivos.

EDTA Ácido etilendiaminetetraacético (Ethylenediaminetetraacetic acid), es un agente quelante de calcio, de uso común. Actúa como anticoagulante y preservativo, uniendo calcio y otros cationes. Por sus propiedades quelantes, es capaz de inactivar varias enzimas necesarias para la formación del coágulo y para la degradación de proteínas y lípidos en sangre.

estasis Una disminución en el flujo de sangre en una parte del cuerpo.

evaporación Transformación de agua en vapor

extracelular Fuera de las células.

flebotomía Punción de una vena con una aguja con el propósito de obtener una muestra de sangre.

glucolítico Relacionado con el proceso del metabolismo de la glucosa.

hemoconcentración El proceso de incremento en la concentración de las células, proteínas, y ocasionalmente otros compuestos analizados en sangre a través de la pérdida de agua, ya sea in vitro o in vivo.

hemólisis Ruptura de glóbulos rojos, liberando al suero o plasma los contenidos en ellos.

heparina Un anticoagulante el cual inhibe directamente la formación de fibrina.

in vitro Literalmente, en vidrio; ocurre en una situación artificial, como en un tubo de ensaye.

in vivo Ocurre en un organismo vivo.

infradiano Cambios en la concentración de compuestos analizados que ocurren con menos frecuencia que una vez al día.

intraindividual Dentro de una sola persona.

intravenoso Dentro de una vena; generalmente se refiere a los fluidos intravenosos, en donde el agua contiene medicamentos, glucosa, o electrolitos que son administrados a un paciente a través de un catéter insertado en una vena.

no laminar Que no está ordenado en forma de capas, con cambios graduales de una capa a otra. En los líquidos, el flujo no laminar produce de fuerzas de ruptura, al ponerse en contacto diferentes capas o laminas.

plasma La parte líquida de la sangre en el torrente sanguíneo; es una muestra obtenida de sangre mediante la colecta con un anticoagulante, con una centrifugación posterior de la muestra.

postprandial Después de comer.

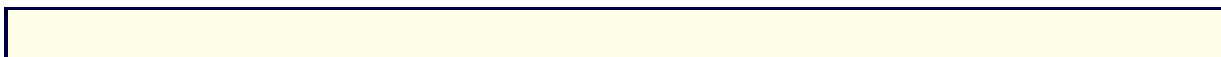
preservativos Sustancias químicas que impiden cambios en la concentración de compuestos analizados en una muestra de sangre, orina, u otro fluido corporal.

proteólisis El proceso de degradación de las proteínas, el cual puede ocurrir por reacciones químicas o procesos enzimáticos.

quelación El proceso de unión de una molécula orgánica (quelante) con múltiples iones metálicos.

revisión delta Comparación de la concentración de un compuesto analizado en la muestra de un individuo, con la misma concentración existente en la muestra anterior, de la misma persona.

separador de suero Un componente mecánico que separa físicamente el suero y las células



(los separadores de plasma separan plasma de las células), previniendo los cambios en la concentración de los compuestos analizados séricos debido al metabolismo celular.

suero La parte líquida de la sangre que queda después de que se ha formado un coágulo.

TBEP Tri(2-butoxietil)fosfato, una sustancia química encontrado en el hule, el cual puede pasar a través del tapón y unirse a proteínas, desplazando sustancias químicas y alterando sus concentraciones en suero (o plasma).

torniquete Un dispositivo mecánico (como una banda ancha de hule) usada en la superficie de una extremidad la cual comprime las venas, haciéndolas aparecer más grandes mediante la prevención del retorno de sangre al corazón y pulmones.

ultradiano Cambios en la concentración de los compuestos analizados los cuales ocurren en un período de tiempo mucho menor que un día.

variación cíclica Cambios en concentración de compuestos analizados los cuales ocurren repetitivamente, en una forma predecible, durante un período dado de tiempo.

variación circadiana Cambios en la concentración de compuestos analizados la cual ocurre durante el transcurso de un día.

variación preanalítica Factores que alteran los resultados de una prueba de laboratorio, y que ocurren antes de realizar la prueba.

venoso Relacionado con las venas, los vasos que retornan la sangre de los tejidos al corazón y pulmones.

Las pruebas de laboratorio, que miden un compuesto analizado en un espécimen de sangre u otro fluido corporal, son ordenadas por los médicos para evaluar el estado del paciente. Se asume que el resultado analítico obtenido es representativo de la concentración real del compuesto analizado en el paciente. Desafortunadamente, hay numerosos factores que pueden invalidar esta suposición. Los errores pueden ocurrir debido a tendencias analíticas; el control de calidad tradicional está dirigido hacia la minimización de errores. Sin embargo, un número de errores no analíticos pueden también cambiar la concentración de uno o más compuestos analizados en un espécimen de tal forma que los resultados no reflejan la condición fisiológica del paciente. Éstos son llamados colectivamente fuentes de error preanalítico. De la misma forma que el control de temperatura, longitud de onda, y tiempo de incubación limitarán el error analítico, el error preanalítico también puede ser controlado. El propósito de este capítulo es detallar las fuentes comunes de error preanalítico y los métodos que pueden ser usados para controlarlos.

Es responsabilidad de los laboratorios tomar medidas que minimicen las fuentes de error, desarrollando procedimientos estándares que establezcan la preparación del paciente, colecta de la muestra, métodos de transporte, y preservación de muestras. Las agencias que acreditan los laboratorios, incluidos el Colegio de Patólogos Americanos ("College of American Pathologists," o "CAP", en inglés) y la Comisión Unida para la Acreditación de Organizaciones del Cuidado de la Salud ("Joint Commission on Accreditation of Health Care Organizations" o "JCAHCO" en inglés), requieren que cada laboratorio provea un manual detallado que documente el método apropiado para la colecta de especímenes. Es recomendable incluir en este documento los procedimientos usados para minimizar errores en cada punto donde puede desarrollarse una variación.

Causas de Variación Previas a la Colecta

Variables del ciclo biológico

Variación cíclica se refiere a los cambios en concentración de los compuestos analizados, que ocurre en una forma predecible a ciertas horas del día, semana, o mes. El estudio de tales cambios cíclicos es llamado "cronobiología".^{ref(76)} La variación rítmica es típica de muchas funciones biológicas; la variación diurna en el metabolismo de drogas y la incidencia de infarto al miocardio son dos ejemplos de la importancia de este campo.^{ref(77)} La variación cíclica más reproducible es la variación *circadiana*, la cual ocurre durante el transcurso de un solo día. Se sabe que la melatonina, un compuesto producido por la glándula pineal en respuesta a la oscuridad, afecta la función de muchas partes del eje hipotalámico-pituitario.^{ref(78)} Como resultado, la concentración de la mayoría de las hormonas pituitarias se incrementa en las noches y disminuye durante el día. Aquellas hormonas cuyas concentraciones son afectadas por la estimulación de la pituitaria muestran una variación diurna similar. Los cambios diurnos parecen estar influenciados por los períodos de sueño y vigilia más que por la hora en el reloj. La gente que trabaja turnos irregulares o que ha llegado recientemente a una zona con un horario diferente, típicamente tiene algún retraso en el ajuste de su ciclo diurno; sin embargo, finalmente la concentración de las hormonas pituitarias será más alta durante el período de sueño, disminuyendo gradualmente después de despertar.^{ref(79)} Al reportar la hora de colecta de una muestra para pruebas hormonales, por lo tanto, es necesario indicar la hora en que despertó el paciente. Muchas otras sustancias medidas comúnmente, tales como el hierro^{ref(80)} y la fosfatasa ácida,^{ref(81)} también muestran una prominente variación circadiana.^{ref(82)} La excreción urinaria de la mayoría de los electrolitos, tales como sodio, potasio, y fósforo muestran considerable variación circadiana. El índice de excreción de estos compuestos analizados en especímenes obtenidos a diferentes horas del día pueden diferir hasta un 50%.

Algunas hormonas no son liberadas a la circulación en forma constante, sino que son secretadas en episodios repentinos. Esta variación *ultradiana* es típica de la mayoría de las hormonas pituitarias, como se muestra en la Fig. 3-1. La concentración durante tal secreción repentina puede llegar a ser varias veces el nivel basal. Por lo tanto, una sola muestra, no puede ser representativa de la producción total de la hormona.

La variación cíclica durante un período de tiempo mayor de un día (*infradiana*) también puede afectar los resultados en las pruebas de laboratorio. En mujeres, el ciclo menstrual se asocia con cambios significantes en las concentraciones de hormonas ováricas. También están relacionadas con lo anterior, las fluctuaciones mensuales en las concentraciones de otros compuestos analizados tales como calcio, magnesio, colesterol, hormona paratiroidea, renina, aldosterona, y hormona antidiurética.^{ref(83)} La variación circanual, la cual ha sido reportada en algunas sustancias, está relacionada con cambios en la dieta debido a la estación, o con la variación del clima. Por ejemplo, la concentración en suero de 1,25-dihidroxivitamina D es más alta en el verano que en el invierno,^{ref(84)} y el oxalato urinario es más alto en verano que en otras estaciones (el oxalato está presente en altas concentraciones en las fresas).^{ref(85)} Para otros compuestos analizados, tales como la elevada respuesta de la hormona estimulante de la tiroides (TSH) a la hormona liberadora tiroidea ocurre en verano,^{ref(86)} la causa de esta variación no es clara.

Además de tales variaciones predecibles, las fluctuaciones al azar pueden causar cambios marcados en la concentración de un día a otro. Aunque muchos compuestos analizados como los electrolitos, proteínas, y fosfatasa alcalina muestran menos del 5% de variación intraindividual, la variación de un día a otro puede ser arriba del 20% para sustancias como la bilirrubina, creatina cinasa, triglicéridos, y la mayoría de hormonas esteroideas. La excreción urinaria de creatinina varía aproximadamente un 10% en un determinado individuo, pero muchas otras sustancias excretadas en la orina muestran fluctuaciones del 25 al 50% durante períodos relativamente cortos.^{ref(87)} La Tabla 3-1 enumera la variabilidad biológica a largo plazo para un número de compuestos analizados comunes.

Pruebas Sujetas a Variación Diurna
Fosfatasa ácida * ACTH Catecolaminas Cortisol (y otros esteroides adrenales) Gastrina* Hormona del Crecimiento* Tolerancia a la Glucosa Hierro Osteocalcina* Hormona Paratiroidea* Prolactina* Renina/aldosterona TSH*
*Más alta en PM; todas las otras más altas en AM

Pruebas Afectadas por la Ingestión de Alimentos
Cloro* Gastrina Glucagon Glucosa Hormona del Crecimiento Insulina Calcio Ionizado Fosfato * Potasio * Triglicéridos pH en Orina
*Más bajo después de los alimentos; todos los demás, más altos

Variables físicas relacionadas con el paciente



El ejercicio es una causa común controlable de variación en los resultados de las pruebas de laboratorio. Dentro de las pruebas químicas de rutina; el potasio, fósforo, creatinina, y proteínas séricas son significativamente alteradas por un período breve de ejercicio.^{ref(88)} Con el ejercicio regular, hay un aumento en las enzimas relacionadas con la actividad muscular y un aumento en la concentración de ácido úrico en sangre (Fig. 3-2). El ejercicio intenso, como correr en un maratón, produce una rápida elevación en la concentración de potasio, ácido úrico, bilirrubina, y enzimas musculares, mientras que la concentración de glucosa y fósforo disminuyen significativamente.^{ref(89)} En personas que están en entrenamiento para competencias de distancias largas, las concentraciones de gonadotropina y esteroides sexuales están marcadamente disminuidas, mientras que la concentración de prolactina está aumentada.^{ref(90)}

Los cambios en los resultados de las pruebas de laboratorio relacionados con la dieta abarcan muchos compuestos analizados; la mayoría son transitorios y fácilmente controlables. Después de la ingestión de una comida, hay un incremento en la concentración de las sustancias que se absorben de los alimentos, como glucosa y triglicéridos. Además, las concentraciones de sodio, ácido úrico, hierro, y deshidrogenasa láctica están significativamente alteradas después de una comida^{ref(91)} mostrando un aumento postprandial. Las hormonas que son secretadas en respuesta a la ingestión de alimentos, como gastrina e insulina, también mostrarán un incremento postprandial. La concentración plasmática de sustancias, como el potasio y el fósforo, que entran a las células bajo la influencia de la insulina, disminuirán después de las comidas. Las sustancias presentes en la comida pueden interferir químicamente con los resultados de las pruebas, tales como la vainillina, la cual interfiere con el análisis químico del ácido vanilmandélico y la serotonina dietética puede aumentar la concentración urinaria de ácido 5-hidroxi-indolacético. Las pruebas de sangre oculta en heces, las cuales identifican el grupo hemo son afectadas por la ingestión de carne y, en algunos casos por ingestión de hierro y rábano.^{ref(92)} La variación en la dieta puede también inducir cambios de mayor duración en las pruebas de laboratorio; las alteraciones en la ingestión de proteínas están asociadas con cambios reversibles en la excreción urinaria de creatinina y en la depuración de creatinina.^{ref(93)}

El estrés, ya sea físico o mental, puede alterar en forma reversible los resultados de varias pruebas de laboratorio. Es bien sabido que el estrés induce la producción ACTH, cortisol, y catecolaminas. Aún un ligero estrés, como el causado por el piquete de una aguja, la preparación para un examen, o la admisión voluntaria en un hospital, puede ser suficiente para causar cambios. Aunque el colesterol total puede aumentar con un ligero estrés,^{ref(94)} el colesterol HDL sufre una disminución de alrededor del 15%.^{ref(95)} La preparación de la región cubital anterior para venipuntura puede causar un marcado aumento de las catecolaminas plasmáticas. El estrés más severo causa cambios más profundos. Después de un infarto agudo al miocardio, el colesterol comienza a disminuir alrededor de las 24 horas y puede alcanzar una disminución máxima del 60% valor basal, regresando a los valores típicos del paciente después de tres meses.^{ref(96)} Los pacientes en las unidades de cuidado intensivo tienen una supresión en la producción de varias hormonas pituitarias^{refs(97)} y aldosterona.^{ref(98)} Debido a estos cambios, la evaluación voluntaria de la función endocrina y el estado de los lípidos no deben combinarse con la admisión hospitalaria por otras causas.

La postura es una causa de variación preanalítica fácilmente controlable. En la posición de pie, un incremento en la presión hidrostática causa pérdida de agua y electrolitos

procedentes del compartimento del líquido intravascular, resultando en un aumento en la concentración de proteínas. Si la flebotomía se lleva a cabo antes de que el paciente tenga cuando menos 15 minutos de estar sentado después de un tiempo de haber estado de pie, se producirá una hemoconcentración del 5 al 8%, [ref\(99\)](#). Este aumento puede producir diferencias importantes clínicamente en las concentraciones de calcio, colesterol y lipoproteínas. En posición supina, el agua y los electrolitos regresan al espacio vascular, resultando en una disminución proporcional en la concentración de proteínas. La diferencia en la medición de la concentración de hemoglobina entre la hora de admisión en el hospital (cuando al paciente pudo haber tenido una flebotomía después de haber estado de pie por un tiempo) y la mañana siguiente (cuando al paciente se le pudo haber extraído sangre mientras descansaba en la cama) puede conducir al médico a sospechar que el paciente ha desarrollado una hemorragia interna o hemólisis.

Procedimientos para minimizar las variables en el paciente

Las etapas importantes para controlar las variables en el paciente incluyen el obtener una buena historia clínica del paciente, y dar instrucciones claras al flebotomista y al paciente, así como verificar que se sigan los protocolos establecidos.

Variables biológicas cíclicas.

El laboratorio debe determinar cuales de las pruebas realizadas tienen cambios significativos de concentración, ya sean cíclicos o relacionados con la ingesta de alimentos; las Tablas 3-2 y 3-3 enumeran las pruebas más importantes que son afectadas de esta manera. En condiciones óptimas, los especímenes para estas pruebas deben ser colectados tan pronto como el paciente despierte y que todavía esté en ayunas. Si hay un patrón de variación ultradiana, como lo hay para la mayoría de las hormonas pituitarias, se deben coleccionar varios especímenes a intervalos mayores del ciclo usual para proveer una noción exacta sobre la producción de hormonas, [ref\(100\)](#). Por ejemplo, para las gonadotropinas, es recomendable coleccionar tres o cuatro especímenes con una diferencia mínima de media hora entre cada toma, y mezclar el suero de todas ellas antes de realizar el análisis. Un método más sofisticado consiste en colocar un catéter intravenoso en el paciente y a través de él obtener las muestras cada hora durante un día. Cada espécimen es analizado en forma separada, y la concentración se gráfica contra la hora del día en que fue obtenido. Se reporta el área bajo la curva como una medida integrada de producción de la hormona.

Variables físicas.

Si se están coleccionando muestras, para medir compuestos analizados que son afectados por el ejercicio, es necesario interrogar al paciente para saber si ha llevado a cabo ejercicios vigorosos durante las ultimas 24 a 48 horas. Cualquier historia de ejercicio vigoroso debe ser anotada en la forma de requisición y debe incluirse en el reporte final. Otra alternativa es pedir al paciente que regrese después para la toma de esa muestra. El estado de estrés antes de la toma de muestra es difícil de controlar; sin embargo, los médicos deben estar informados sobre aquellas pruebas que son afectadas, así como de la magnitud del cambio inducido por el estrés ya sea físico o mental. Hay casos en que resulta recomendable que el laboratorio solicite asesoría especial antes de llevar a cabo pruebas que son severamente afectadas por el

estrés del paciente, tales como las pruebas de función adrenal o pituitaria, metabolitos de catecolaminas, análisis de lípidos, y prueba de tolerancia a la glucosa. Los efectos debido a la postura pueden minimizarse pidiendo a los pacientes ambulatorios que permanezcan sentados por lo menos 15 minutos antes de la extracción de la sangre. Para los análisis que sufren alteraciones por la dieta, incluyendo las mediciones de tolerancia a la glucosa, hidroxiprolina, 5-HIAA, y los metabolitos de las catecolaminas urinarias, es recomendable proveer al paciente con las indicaciones por escrito antes de ser programado para la colecta de la muestra. Si pruebas tales como la medición de renina y aldosterona, tolerancia a la glucosa, orina de 24 horas, grasa en heces de 72 horas, requieren preparación especial del paciente, resulta buena práctica citar al paciente antes para entregarle una explicación detallada en una hoja impresa.

Causas de Variación en la Colecta de Sangre

Técnicas para la colecta de sangre

El uso incorrecto de los procedimientos para obtener especímenes puede introducir significativo error en los resultados finales de las pruebas de laboratorio; los errores relacionados con la colecta de muestras en el laboratorio son las causas más comunes de resultados erróneos. Muchas publicaciones^{refs(101)} detallan en forma apropiada los procedimientos en la ejecución de flebotomías para obtener muestras de sangre, y los programas de certificación en flebotomía han establecido los estándares para capacitar y educar a los flebotomistas. En hospitales de enseñanza, la flebotomía es llevada a cabo por una variedad de individuos (enfermeras, asistentes de médicos, y estudiantes) quienes tienen un entrenamiento formal limitado, o incluso carecen de él, en técnicas de flebotomía.

En la mayoría de los laboratorios, los especímenes son colectados usando tubos al vacío y agujas especialmente diseñadas, que permiten simultáneamente la punción de la vena y del tapón del tubo. Los tubos para colecta son típicamente hechos de vidrio, aunque los tubos de plástico están siendo usados más frecuentemente; ambos son apropiados para la mayoría de las pruebas.^{ref(102)} Muchos tubos están cubiertos con silicón, el cual reduce la adhesión del coágulo, permitiendo mejor separación del suero y de las células. Los tapones están típicamente hechos de hule. En viejas formulaciones se usó el tri(butoxietil)fosfato (TBEP) como plastificante; este compuesto es capaz de disociar varios medicamentos de sus proteínas de transporte. Los medicamentos entonces se difunden dentro de los eritrocitos, reduciendo la concentración de la droga en el suero. El TBEP ha sido retirado de la mayoría de los tapones de uso común. Algunos tubos tienen tapas protectoras especiales sobre los tapones que no están en contacto directo con la sangre, disminuyendo el riesgo de transmisión de agentes infecciosos.

En algunos casos, la sangre es extraída con una jeringa y entonces se transfiere al tubo para trasladarla al laboratorio. Este procedimiento, presenta el riesgo de contaminación para el flebotomista durante la transferencia de la muestra. El método más seguro para preparar alícuotas de muestras es seleccionar los tubos necesarios que contienen anticoagulantes o preservativos y retirar los tapones de los tubos antes de coleccionar la muestra. Después de coleccionar la muestra, se desprende la aguja de la jeringa, y la sangre es vaciada en los tubos; entonces se colocan nuevamente los tapones. La inyección de la sangre en los tubos vacíos

incrementa el riesgo de punción en la piel por la aguja y también incrementa el riesgo de producir hemólisis en la muestra (ver pág. 110).

En niños y adultos con difícil acceso venoso, puede hacerse una punción capilar para la obtención de la muestra. Ciertos microtubos especiales, que contienen anticoagulantes, pueden llenarse por capilaridad. Si las muestras van a ser transportadas al laboratorio, estos tubos capilares deberán contener una pequeña pieza metálica que debe moverse a través de la muestra por medio de un imán para mezclar la sangre inmediatamente después de colectarla y antes de someterla a centrifugación o análisis (Figura 3- 3). Si la prueba se va a realizar cerca del lugar de la toma, como es típico para muchos de los instrumentos portátiles usados cerca del paciente, estos aditamentos para mezclar la sangre no son necesarios, ya que la tardanza entre la colecta y el análisis es mínima. La contaminación de la muestra con fluidos de tejido es una causa potencial de preocupación en todos los procedimientos de colección capilar de sangre, ya que el fluido tisular virtualmente no contiene proteínas y, por lo tanto, no tiene compuestos analizados unidos a proteínas. Este tipo de contaminación puede ser minimizado usando solo la sangre que fluye libremente del sitio de punción. Es por lo tanto inaceptable obtener sangre aplicando presión al tejido cerca del sitio de punción.

Tipos de muestras de sangre

Las diferencias que existen entre sangre arterial, venosa y capilar, son causas ocasionales de resultados erróneos. *La sangre arterial* es la fuente de nutrientes para todos los tejidos del cuerpo, y es la mejor muestra para el análisis de la distribución de sustancias necesarias para los tejidos corporales como el oxígeno. *La sangre venosa* difiere de la sangre arterial en que tiene menores concentraciones de sustancias usadas en el metabolismo, tales como oxígeno y glucosa, y más altas concentraciones de productos de desecho tales como ácidos orgánicos, amoníaco, y dióxido de carbono. La magnitud de la diferencia en la concentración de estos compuestos analizados entre la sangre arterial y venosa es dependiente de la perfusión tisular; con poca perfusión, la diferencia se incrementa. Se ha sugerido la medición de la diferencia en gases sanguíneos entre sangre arterial y sangre venosa central, como una medida generalizada de la perfusión tisular para monitorear pacientes en shock. [ref\(103\)](#) La sangre capilar en general, es más cercana en su composición a la arterial, que la venosa. Si se mantienen tibios sitios específicos, como el lóbulo de la oreja o el pie, se pueden obtener muestras de sangre capilar que son muy parecidas a las de sangre arterial. En estados de poca perfusión tisular y en los neonatos, sin embargo, hay una diferencia significativa entre la presión parcial de oxígeno (PO_2) de la sangre capilar y la arterial. La glucosa medida en una muestra por punción de un dedo puede ser 50% más baja que la glucosa medida en plasma venoso de pacientes en shock; [ref\(104\)](#) al menos algunas de las diferencias son causadas por la PO_2 baja en la sangre capilar de los pacientes en shock, lo cual afecta los métodos para glucosa oxidasa en sangre total. Para algunas sustancias, la diferencia entre las concentraciones de sangre capilar y venosa depende de factores hormonales que afectan la extracción del tejido. Por ejemplo, en ayuno, la concentración de glucosa en sangre capilar es similar a la de sangre venosa. En especímenes postprandiales, cuando la concentración de insulina está incrementada, la diferencia entre la concentración de glucosa en sangre capilar y venosa puede aumentar hasta un 15%. [ref\(105\)](#)

Errores relacionados con preservativos y anticoagulantes

Los preservativos y anticoagulantes son ampliamente usados para coleccionar muestras de sangre, orina, y otros fluidos corporales. Cuando se extrae sangre del cuerpo y se deja coagular, ésta se separa en una fase líquida llamada suero y en un coágulo sólido conteniendo células sanguíneas y *fibrina*. Si se añade un anticoagulante como la heparina, la fase líquida es llamada *plasma*. El suero y el plasma son similares en muchos aspectos. El suero difiere del plasma en que carece de fibrina, disminuyendo el total de proteína en un promedio de 3 g/L. En la coagulación, las plaquetas liberan potasio al suero; el potasio en el plasma es normalmente alrededor de 0.2-0.3 mmol/L más bajo que el potasio en suero. Por razones desconocidas, la concentración de fósforo es más baja en plasma por un promedio de 2 g/L. ^{ref(106)} En pacientes con algunos trastornos hematológicos estas diferencias son exageradas. Con estas pocas excepciones, el suero y el plasma heparinizado son usados indistintamente para pruebas de laboratorio. La selección del tipo de muestra depende de la instrumentación, métodos de ensayos, y de la necesidad de rapidez en los resultados.

El plasma heparinizado puede ser separado de las células inmediatamente después de la colecta, por lo tanto dichas muestras de plasma son apropiadas para un análisis rápido en situaciones de emergencia. Aunque la heparina es un anticoagulante efectivo, en varios casos ocurre formación de fibrina después de la separación, la cual puede causar obstrucción en las mangueras y las agujas aspiradoras de muestras en los instrumentos. La heparina puede interferir en algunos sistemas analíticos, tales como el ensayo de lipasa en laminilla seca. El catión usado en sales de heparina (como litio o amonio) puede causar contaminación en las muestras para la medición de estos compuestos analizados. Por estas razones, algunos laboratorios prefieren no usar sangre heparinizada.

Además de la heparina, se usan otros anticoagulantes y preservativos para diversas muestras. La Tabla 3-4 enumera algunas de las sustancias más comúnmente usadas y algunas indicaciones típicas para el uso de estos aditivos. Mientras estos compuestos son esenciales para ciertas pruebas, pueden ser totalmente inapropiados para otras. El EDTA, usado para muestras en hematología, es usado también para algunos ensayos químicos porque la quelación de los cationes divalentes inactiva muchas enzimas y conduce a cambios in vitro de hormonas peptídicas y lípidos. La quelación de cationes tales como el hierro, magnesio, y calcio, sin embargo, causa una disminución artificial de los resultados en la mayoría de los ensayos colorimétricos y reduce la actividad de enzimas que requieren cationes activadores (fosfatasa alcalina, y creatina cinasa). La contaminación de muestras con anticoagulantes, especialmente EDTA, es un problema común en muchos laboratorios.

En nuestro laboratorio, se reciben aproximadamente de 2 a 3 muestras contaminadas con EDTA cada mes. El patrón de anomalías que se ven debido a contaminación con EDTA se muestra en la Tabla 3-5. Para evitar esta contaminación, deben llenarse primero los tubos sin anticoagulantes o preservativos, seguidos por los tubos que contienen anticoagulantes o preservativos. Debido al potencial del EDTA para interferir en muchos ensayos, los tubos conteniendo EDTA deben llenarse al último. Si se está usando anticoagulante líquido, es importante asegurarse que la proporción de sangre y anticoagulante usada sea constante. En muestras con un inadecuado volumen de sangre ("escasa extracción"), puede haber una dilución significativa de la sangre debido a la solución del anticoagulante. Ya que la mayoría de los anticoagulantes no entran a las células, las

alteraciones en el hematocrito afectarán la proporción anticoagulante-plasma. Por ejemplo, los pacientes con hematocrito alto tendrán un exceso relativo de anticoagulante resultando en una dilución del plasma, mientras que en individuos anémicos el anticoagulante puede ser insuficiente.

Efectos de la Contaminación con EDTA

Incremento de Potasio
Reducción de Calcio, Magnesio (ensayos colorimétricos)
Reducción de Fosfatasa Alcalina, Creatina Cinasa

Errores relacionados con los tubos separadores de suero

Los tubos separadores de suero y plasma son usados por muchos laboratorios para simplificar el proceso de separación del suero (o plasma) de los elementos celulares. Si la separación no ocurre, el metabolismo continúa en la fase celular, produciendo una variedad de cambios los cuales se discuten más tarde en este capítulo. Los tubos separadores de suero y plasma, contienen un gel relativamente inerte e impenetrable, el cual tiene una densidad intermedia entre los elementos celulares y el plasma o suero. Durante la centrifugación, el gel se levanta desde el fondo del tubo y forma una barrera mecánica que evita que los cambios metabólicos afecten las concentraciones plasmáticas (Figura 3-4). Los tubos que contienen estos geles pueden ser centrifugados y almacenados sin ser destapados, reduciendo así el riesgo de producir aerosoles infecciosos y evitando en forma simultánea la evaporación. Algunos agentes terapéuticos se adsorben en el gel, disminuyendo falsamente las concentraciones de antidepresivos tricíclicos y ciertas drogas antiarrítmicas como flecainide. Con estas excepciones, la mayoría de sustancias en plasma no son afectadas por el uso de geles separadores.

Errores relacionados con las técnicas de colecta inadecuada

Torniquetes.

El uso de los torniquetes es una importante causa, controlable, de variación en los resultados de pruebas de laboratorio. Los torniquetes son ampliamente usados en flebotomías para bloquear el retorno venoso, causando dilatación de las venas y haciendo más fácil la identificación de un sitio de venopunción. Los torniquetes a menudo se dejan colocados durante el proceso de venopunción asumiendo que la continua dilatación venosa permitirá una colecta más rápida de la muestra y evitará el "colapso" de la vena. Aunque los torniquetes hacen el proceso de flebotomía más fácil, la disminución en el flujo de sangre que éstos inducen causa cambios en los resultados de las pruebas de laboratorio que pueden predecirse. Un minuto después de aplicar el torniquete, el incremento de presión causa pérdida de agua y electrólitos del plasma hacia el espacio del fluido extracelular, produciendo una elevación en la concentración de proteínas, células, y sustancias unidas a células y proteínas. Después de tres



minutos, generalmente hay un incremento del 5 a 8% en la concentración de proteínas. Si un torniquete se deja por 15 minutos, la elevación en la concentración puede alcanzar hasta 15%. La magnitud de estos efectos puede diferir entre el primero y el último tubo colectados, mostrando una hemoconcentración mayor en las últimas muestras. Una preocupación adicional con el uso del torniquete es la disminución relativa del flujo de sangre. Las concentraciones de subproductos metabólicos tales como el lactato y el ion hidrógeno aumentan en el tejido, y el restablecimiento del flujo sanguíneo después de retirar el torniquete causa una elevación en la concentración de lactato venoso. Cuando la sangre es colectada usando un torniquete, se le pide al paciente que apriete y relaje su puño en forma alternada para incrementar la velocidad de colecta de los especímenes. No solo hay poca evidencia en la eficacia de este procedimiento, sino que éste también puede ser la causa de hiperkalemia artificial (Figura 3-5).[ref\(107\)](#)

Hemólisis.

La hemólisis ocurre cada vez que hay un trauma de los relativamente frágiles eritrocitos, ya sea durante la colecta, o con menor frecuencia después de la flebotomía. Una causa poco común de hemólisis, es cuando se lleva a cabo la flebotomía antes de que se seque el alcohol o cualquier otro desinfectante usado. Frecuentemente la hemólisis es causada por un flujo turbulento no laminar, durante el proceso de colecta. Dentro de los tamaños de agujas que comúnmente se utilizan, la hemólisis no es causada por el uso de agujas muy grandes o muy pequeñas. El flujo no laminar ocurre comúnmente cuando la sangre se mueve muy lentamente o demasiado rápido a través de la aguja. Si la sangre se extrae con una jeringa, al sacar el embolo con fuerza o al inyectar la sangre en los tubos usando presión en el embolo, generalmente se produce hemólisis. Similarmente, el flujo de sangre lento de una vena colapsada depositado a un tubo con vacío a menudo produce una muestra hemolisada. La turbulencia en un tubo conteniendo sangre también puede causar hemólisis después de haber terminado la colecta; los transportadores mecánicos y centrífugas en mal estado son causas raras de hemólisis, como se discute en el siguiente capítulo.

La hemólisis altera los resultados de las pruebas de laboratorio en dos formas. La más importante de todas, que el contenido de los glóbulos rojos es liberado, incrementando la concentración de sustancias intracelulares tales como lactato deshidrogenasa (LD), potasio, y magnesio, mientras que disminuye la concentración de solutos extracelulares como el sodio. Ya que la actividad dentro de los eritrocitos para la LD es aproximadamente 150 veces más alta y la concentración de potasio es 30 veces más alta, la hemólisis eleva falsamente los niveles en plasma y suero de estos compuestos analizados. Debido a que la hemoglobina absorbe la luz sobre la mayor parte del espectro visible y en el ultravioleta, la hemólisis puede interferir con los resultados de muchos ensayos espectrofotométricos. El cuadro abajo muestra las pruebas más comúnmente afectadas por la hemólisis y la naturaleza de la interferencia en cada ensayo.

Efectos de la Hemólisis en Pruebas Químicas
Aumentos debidos a la liberación de sustancias provenientes de los eritrocitos



Potasio, magnesio, LDH, ASAT, proteínas totales, hierro, fosfato, amonio

Aumentos causado por interferencias en el ensayo

Colesterol, triglicéridos, CC, CC-MB (inmunoinhibición)

Disminución causada por interferencias en el ensayo

Bilirrubina (espectrofotometría directa), caroteno, insulina, albúmina

Contaminación con fluidos intravenosos.

La contaminación con fluidos intravenosos puede ser una importante causa de variación en los resultados de las pruebas. A muchos de los pacientes hospitalizados, se les administra fluidos intravenosos, los cuales típicamente tienen una concentración más alta de glucosa, drogas y algunos electrolitos, que los que están presentes en la sangre. La contaminación con fluidos intravenosos ocurre cuando la sangre es extraída de una vena conectada a la vena que tiene el catéter. Aunque pudiera parecer que una vena en el antebrazo es suficientemente distante del catéter, hay una gran cantidad de conexiones anastomóticas. Cualquier extracción de sangre de una vena en el mismo lado donde está instalado un catéter corre el riesgo de experimentar contaminación por fluidos. En muchos casos, la sangre es extraída mediante la conexión de un catéter. Ha sido demostrado que, para la mayoría de los compuestos analizados, el remover y descartar un volumen de sangre igual al volumen del catéter resulta adecuado para evitar la contaminación. En el caso de los medicamentos administrados a través de un catéter (incluyendo heparina y potasio), el volumen que se descarta puede ser más de 5 veces el volumen del catéter para evitar resultados incorrectos. En pacientes que reciben fluidos intravenosos, por un tiempo largo, comúnmente se usa un catéter “multilumen” a fin de proveer un acceso para la colecta de sangre. Aún, si la sangre es extraída de este acceso por separado, puede todavía ocurrir contaminación si los fluidos intravenosos están siendo administrados a través de un lumen diferente.

El patrón más común de interferencia por fluido intravenoso es un marcado incremento de concentración en la sangre de las sustancias contenidas en el fluido. La concentración de potasio en un fluido intravenoso puede ser diez veces más alto que el de la sangre, y la concentración de glucosa en un fluido intravenoso es de 50,000 mg/L. Las concentraciones de drogas son típicamente 100 veces más altas que las existentes en la sangre cuando el fluido es administrado lentamente. Puede ocurrir con menor frecuencia, que haya suficiente líquido presente para diluir realmente la concentración de los constituyentes normales de la sangre, incluyendo los solutos tales como urea y creatinina; en la mayoría de los casos de contaminación por fluidos, estos son alterados mínimamente.

Errores relacionados con la identificación del paciente y la muestra correspondiente

Debido a que no hay forma de probar que una muestra sin etiqueta pertenece a un paciente dado, resulta esencial la identificación apropiada de las muestras. Mientras que el etiquetado puede parecer la parte más simple de la colecta de muestras, en la mayoría de los laboratorios es la causa más común de resultados erróneos. En nuestro hospital,



aproximadamente el 1% de las muestras que no se extrae por el personal del laboratorio, es recibido con una identificación inadecuada. Aproximadamente el 0.05% son recibidas con una incorrecta identificación del paciente. Aunque los errores pueden ser cometidos cuando se etiquetan muestras de pacientes con nombres similares, la causa más común de identificación inadecuada de las muestras es la negligencia por parte del flebotomista al etiquetar las muestras antes de abandonar el lugar de extracción donde está hospitalizado el paciente. En nuestro laboratorio, alrededor del 99% de las muestras mal etiquetadas ocurren de esta forma.

Cadena de custodia

En ciertas situaciones, como en las pruebas forenses, se requiere de la identificación positiva de muestras en cada etapa del proceso de colecta, transporte, y análisis. Para estos especímenes debe usarse un formato apropiado de cadena de custodia (Fig. 3-6). De acuerdo con los lineamientos publicados por el Instituto Nacional de Abuso de Drogas ("National Institute of Drug Abuse", o "NIDA", en inglés), [ref\(108\)](#) la identificación positiva comienza colocando un sello inviolable en el recipiente que contiene la muestra antes de que ésta sea retirada de la vista del donador; la etiqueta típicamente es marcada por el propio donador con sus iniciales y a veces, por testigos. Después de que el donador certifica en la forma para la cadena de custodia que la muestra fue obtenida de él o ella, cada persona que toma posesión de la muestra firma en la forma y anota la fecha y hora que la muestra fue transferida a la siguiente persona para la continuación del proceso del análisis. Normalmente, cada persona certifica que la muestra fue mantenida en condiciones seguras durante el tiempo que estuvo bajo su custodia. Esto asegura que el resultado será legalmente aceptable en el tribunal de justicia, ya que este resultado puede ser identificado directamente con la persona de quien se obtuvo el espécimen.

Procedimientos para minimizar variaciones relacionadas con la flebotomía

Los procedimientos para minimizar la variación relacionada con la colecta de muestras, generalmente están bajo el control del laboratorio. Por lo tanto, el laboratorio debe tener una guía clara por escrito que ayude a minimizar los errores, al igual que debe trabajar muy de cerca con el equipo de flebotomistas, administración de enfermería, y médicos. Las guías para la flebotomía de cada prueba que el laboratorio realiza deben incluirse en el manual del laboratorio. Los lineamientos deben especificar el tipo de muestra a colectar, el volumen de muestra necesaria, y si se requiere sangre arterial, venosa o capilar. Se deben monitorear la frecuencia de errores en las flebotomías, como lo sugieren las regulaciones de la CLIA '88 (ver Capítulo 2).

Identificación del paciente.

La etapa inicial en la prevención de errores en la colecta es la identificación exacta del paciente antes de colectar la muestra. Cuando se trabaja con pacientes de consulta externa, se debe preguntar el nombre, incluyendo la correcta escritura del apellido, y cualquier número de identificación necesario (registro del paciente o número de seguro médico). En pacientes hospitalizados se debe preguntar el nombre, y confirmar la identificación comparando los



datos que proporciona el paciente con los que están anotados en la banda hospitalaria de su brazo. El número de identificación hospitalaria del paciente debe compararse con el numero registrado en la solicitud del laboratorio, para asegurar que son idénticos. Si el paciente tiene más de una banda de identificación, hay que revisar todas las bandas para asegurar que tengan la misma información; hay una frecuencia relativamente alta de errores en el etiquetado de muestras de pacientes con más de una banda.

Con niños o adultos con enfermedades neurológicas o mentales, es necesaria una forma de identificación más cuidadosa, como por ejemplo una identificación con fotografía. Las etiquetas de las muestras escritas a mano, deben ser claras y legibles antes de alejarse de la cama del paciente; la etiqueta debe incluir el nombre y número de identificación del paciente y la hora y fecha de colecta.

Para ayudar a hacer una identificación apropiada, los sistemas de computación para el laboratorio generalmente proveen de etiquetas preimpresas junto con una lista de colecta (ver Capítulo 18). Muchos laboratorios han empezado a usar el sistema de código de barras para incrementar la exactitud en la identificación positiva del paciente. [ref\(109\)](#) La complejidad de las etiquetas de código de barras varía. Algunas simplemente tienen el nombre y número del paciente, mientras que otras contienen una lista de todas las pruebas que deben ser realizadas en la muestra, la hora en que la muestra fue obtenida, y el nombre de la persona que efectuó la flebotomía. Para verificar la identificación del espécimen se pueden llevar a la cama del paciente unos lectores portátiles de códigos de barras para comparar el código en la etiqueta de la muestra con la información en la banda de su muñeca. Los códigos de barras también eliminan errores tipográficos o de escritura a mano, al identificar las muestras que serán introducidas en los instrumentos para análisis. También pueden ser usados para automatizar las requisiciones de las pruebas en los instrumentos de acceso al azar; además, el código de barras facilita el muestreo al hacer uso del mismo tubo de colecta en varios instrumentos, y de esa manera reduce futuros errores en la identificación de muestras (ver capítulo 18). En un estudio en el cual se usó el código de barras no ocurrió ningún error en la identificación de muestras durante el análisis de 300,000 especímenes. Debido a que existen muchos tipos de códigos de barras disponibles, los laboratorios deben revisar cuidadosamente las especificaciones del fabricante antes de empezar a usar el sistema del código de barras. En los Capítulos 16 y 18 se discute con más detalle el uso de código de barras.

Preservativos y anticoagulantes.

Se debe especificar cualquier preservativo o anticoagulante requerido, y deben especificarse algunas alternativas permitidas. Ya que mucho laboratorios prefieren usar tubos separadores de plasma o suero para la mayoría de las pruebas químicas, aquellas pruebas en las cuales no se pueda usar este tipo de tubos, debe enumerarse claramente; en el cuadro se presenta una pequeña lista de éstos. El uso de un orden específico en la colecta de especímenes evitará la contaminación de la muestras; los tubos sin anticoagulantes son siempre colectados primero, seguidos por los que contienen heparina u otro tipo de anticoagulantes, y al final los que tienen EDTA.

Pruebas en los Cuales los Geles Separadores son Inapropiados

**El compuesto analizado se adsorbe al gel**

Flecainida, antidepresivos tricíclicos, haloperidol

Pruebas donde se requiere sangre completa

Enzimas de los eritrocitos, hemoglobina A_{1c}, plomo, ciclosporina A

Posibles contaminantes en el gel

Elementos traza

Pruebas donde son requeridos preservativos

La mayoría de hormonas peptídicas, renina, catecolaminas

Colecta de la muestra.

En el manual de flebotomía deben incluirse las guías para los procedimientos de flebotomía en pacientes que tienen instalados catéteres. Si el paciente tiene una línea intravenosa, la sangre no debe ser extraída del lado donde está dicha línea, preferentemente del otro brazo. Antes de tomar la muestra se deben proveer instrucciones que especifican la cantidad de sangre que se necesita extraer de la línea intravenosa o intraarterial. Ya que la extracción de un volumen de sangre igual al volumen del catéter es adecuada para la mayoría de los compuestos analizados, el manual debe proveer información del volumen que tienen los catéteres más comúnmente usados. Se debe tener la precaución de *no* extraer la muestra de un catéter en aquellas pruebas que son afectadas más severamente por la contaminación con fluidos, como el monitoreo de drogas terapéuticas.

Aunque pueden ser usadas muchas venas para una punción, el sitio más ampliamente usado es la fosa antecubital del brazo. Debido a que los torniquetes se usan en la mayoría de las punciones venosas, es necesario que se den instrucciones apropiadas sobre el uso del torniquete. El flebotomista puede identificar el sitio de la flebotomía y limpiar la piel antes de aplicar el torniquete; alternatively, el torniquete debería soltarse después de la identificación de una vena adecuada. El torniquete debe ser mantenido por un período tan corto como sea posible, preferentemente menos de un minuto, antes de que la flebotomía sea realmente llevada a cabo. Cualquier antiséptico usado debe dejarse secar antes de coleccionar la muestra para minimizar la posibilidad de hemólisis. Los especímenes deben coleccionarse sólo si la sangre está fluyendo libremente; de otra manera las muestras de sangre venosa pueden hemolizarse, y los especímenes de sangre capilar pueden ser diluidos con fluido tisular. Debido a que las pruebas de química sanguínea son generalmente más afectadas por la hemoconcentración, deben extraerse primero las muestras para estas pruebas. No se debe pedir al paciente que apriete y suelte el puño durante la colecta ya que esta acción estimulará la liberación de metabolitos musculares dentro de la vena.

Causas de Variación Posteriores a la Colecta

Las causas de variación posteriores a la colecta son más fácilmente controladas por el laboratorio que las variaciones relacionadas con la flebotomía, ya que es posible desarrollar criterios para las condiciones aceptables de almacenamiento y manejo de muestras después de



la colecta, durante el tiempo que las muestras están en posesión del laboratorio. Dentro de las variables en el manejo de muestras que afectan los resultados de las pruebas están; transporte, separación del suero de los elementos celulares, y las condiciones de almacenamiento.

Transporte de las muestras

Errores relacionados con el transporte de muestras.

Generalmente las muestras son transportadas por los flebotomistas o por los mensajeros. Una tardanza razonable en la transportación es por lo general bien tolerada para la mayoría de los compuestos analizados, ya que los cambios metabólicos ocurren relativamente despacio a temperatura ambiente. En general, la tardanza hasta de una hora no cambia la concentración de la mayoría de los compuestos analizados. La glucosa, a menudo considerada una de las sustancias más lábiles en la sangre disminuye alrededor de 2 a 3% por hora, a temperatura ambiente, en tubos sin inhibidores glucolíticos como el fluoruro.^{ref(110)} Una muestra de gases sanguíneos arteriales es probablemente el espécimen más sujeto a errores de manejo. La Tabla 3-3 enumera las causas comunes de cambios en los resultados de gases en sangre arterial, la dirección y la magnitud relativa de los cambios inducidos. Los productos del metabolismo (como lactato, amonio y el ion hidrógeno) se acumulan en el plasma después de la toma de la muestra, a menos que las reacciones enzimáticas sean retardadas. Otros procesos metabólicos, como la proteólisis, también ocurren a temperatura ambiente. Los péptidos que son susceptibles a degradación por proteasas plasmáticas, generalmente disminuyen en concentración; sin embargo, el precursor de la renina (pro-renina) será convertido a renina enzimáticamente activa si se deja enfriar el plasma lentamente.^{ref} (111)

Procedimiento para minimizar errores de transportación

Preservación de muestras durante la transportación.

Para minimizar la variación posterior a la colecta, los especímenes deben ser entregados y almacenados rápidamente después de la toma de muestras. Los compuestos analizados que están sujetos a cambios de concentración in vitro a temperatura ambiente, deben ser transportados en hielo inmediatamente al laboratorio. Las instrucciones de manejo deben ser claras; en muchos casos, las muestras son colocadas incorrectamente sobre hielo, o son transportadas sobresaliendo de un recipiente con hielo o sumergidas en hielo sin agua. Debido a que un sólido conduce calor más lentamente que un líquido, las muestras manejadas de esta manera no se enfriarán tan rápido y pueden mostrar cambios en la concentración del compuesto analizado. Aunque el enfriamiento de las muestras durante su transporte minimiza muchos cambios artificiales en la concentración de compuestos analizados, el enfriamiento también incrementa la liberación de potasio de las células.

Para una sustancia que sufre cambios en la concentración debidos al metabolismo in vitro, debe indicarse un tiempo específico tolerable de retraso. Las dos técnicas más comunes para evitar el metabolismo de glucosa son; el uso de inhibidores glucolíticos, como el fluoruro o el yodoacetato, y el enfriamiento del espécimen en agua con hielo. Si se usan tubos sin anticoagulantes o con separador de suero, debe pasar por lo menos media hora antes de la centrifugación de la muestra para permitir la formación completa del coágulo. Los tubos que tienen aceleradores del coágulo o anticoagulantes pueden ser centrifugados inmediatamente.



Después de la centrifugación, los tubos para colecta de muestras sin barrera de gel, deben ser separados del plasma o suero de las células tan pronto como sea posible para evitar artefactos.

Uso de transportadores mecánicos. La transportación de las muestras al laboratorio generalmente causa retraso en el procesamiento. Un estudio del Colegio de Patólogos Americano sobre pruebas del laboratorio de urgencias, mostró que el transporte de especímenes por mensajeros aumenta en promedio del 60 al 100% del tiempo total para la entrega de resultados en las pruebas de urgencias.^{ref(112)} Los transportes de sistemas mecánicos, generalmente usan tubos neumáticos, y son empleados por varios laboratorios para una entrega acelerada de muestras. Los sistemas cuidadosamente diseñados pueden reducir marcadamente el tiempo necesario para que las muestras lleguen al laboratorio. En contraste con el tiempo promedio de 30 minutos por el transporte manual, el tiempo promedio con el sistema neumático de tubos en un hospital fue de 2 minutos. Por lo tanto el sistema de tubos neumáticos tiene el potencial de reducir la necesidad de recurrir a laboratorios satélite y a los equipos de prueba destinados a usarse cerca del paciente. Sin embargo, el sistema de tubos neumáticos puede producir trauma a los eritrocitos. El riesgo de hemólisis se incrementa con el uso de tubos que no son llenados completamente con la muestra, por una repentina desaceleración, y por movimientos bruscos en el sistema de tubos. Un empaquetado incorrecto puede incrementar el número de tubos rotos durante el tránsito. El sistema de tubos neumáticos debe ser monitoreado periódicamente para asegurar que la velocidad de los tubos no se incremente más allá de los límites aceptables. Para estos propósitos, puede ser útil el monitoreo para determinar la prevalencia de muestras hemolisadas.

Transporte a sitios remotos.

Cuando las muestras son transportadas a sitios remotos de análisis, como los laboratorios de referencia, pueden ocurrir cambios en la concentración de muchas sustancias. En general, a menos que el ensayo requiera realizarse específicamente en sangre total, es mejor la separación física del plasma o suero de las células antes de preparar la muestra para su envío. Para evitar rompimientos durante el tránsito, es preferible el uso de tubos de plástico firmemente cerrados. Deben tomarse precauciones para evitar el descongelamiento de muestras congeladas. Aunque la mayoría de los laboratorios de referencia sugieren el uso de recipientes aislantes con hielo seco, los servicios de entrega de 24 horas se han vuelto suficientemente confiables, para que la mayoría de muestras puedan ser preservadas adecuadamente mediante el uso de bolsas reusables de hielo “ice packs”. Las muestras deben ser empaquetadas en forma segura para evitar derrames y deben ser marcadas como potencialmente infecciosas.

Procesamiento de muestras

Errores originados debido al procesamiento incorrecto de las muestras.

La centrifugación es el método más comúnmente usado para la separación inicial del suero y las células. Los principios de centrifugación están cubiertos en el Especimen 1. En general, la centrifugación de muestras por 5 a 10 minutos a 1000-2000 G es adecuada para la completa separación del suero y eritrocitos, incluyendo las muestras que contienen geles

separadores de suero o plasma. Las muestras para obtener suero deben ser centrifugadas únicamente hasta que la formación del coágulo sea completa (al menos 20 a 30 minutos después de su colecta). Cuando se usan geles separadores, las centrifugas con rotor horizontal producen mejor separación mecánica. En nuestro laboratorio, almacenamos muestras con geles separadores hasta por 72 horas sin obtener cambios significativos en la concentración de la mayoría de los compuestos analizados, siempre y cuando no haya puntos visibles de contacto entre las células y el suero. Con centrifugas de cabezal de ángulo fijo, ocasionalmente pueden haber espacios que permiten el contacto del suero con las células.

Se debe tener la precaución de revisar que realmente el coágulo se haya formado, ya que puede haber razones fisiológicas para que ocurran tiempos prolongados de formación del coágulo. Por ejemplo, las muestras de pacientes de diálisis pueden continuar coagulándose por horas después de la colecta debido a la heparina empleada en la preparación de los pacientes para diálisis. En tales casos, pueden usarse; la recentrifugación, filtros de suero, y aplicadores de madera para remover la fibrina restante. Con tubos que no contienen geles separadores, es necesaria una etapa adicional para completar la separación. Antes de la centrifugación, los artículos tales como perlas de vidrio, tapones, o cualquier otro objeto mecánico puede ser adicionado a los tubos para realizar la misma función que el gel. Después de la centrifugación, pueden insertarse cilindros huecos, conteniendo filtros o válvulas de un sentido en una de las terminales, en un tubo de colecta para proveer una barrera física, y a la vez se pueden usar pipetas para remover manualmente el suero. El rendimiento del suero obtenido cuando se usan métodos alternativos de separación es menor que el obtenido con geles. El uso de estos procedimientos alternativos en lugar de los geles separadores incrementa el riesgo de derrames y consecuentemente de infección, por lo que a menudo incrementan los costos del laboratorio.

Como se discutió antes, el suero debe ser separado de las células, de otra manera las células sanguíneas continuaran llevando a cabo sus funciones metabólicas y alterarán la composición del espécimen. Aunque esto ocurre más rápida y dramáticamente en mediciones de gases sanguíneos, cambios más sutiles ocurren con el retardo en la separación de otras muestras. A temperatura ambiente, la glucólisis continúa lentamente, con una disminución en la concentración de glucosa a una velocidad un promedio del 3% por hora. Después de aproximadamente 24 horas, la falta de glucosa causa pérdida de potasio y de pequeñas proteínas, tales como enzimas de las células; y el rompimiento de compuestos de fosfato orgánico causa una elevación en el fosfato inorgánico. Después de varios días, se observa una visible hemólisis. Si las muestras son refrigeradas sin separación, la glucólisis es inhibida, pero ocurre la pérdida de potasio y de enzimas.

En muestras de personas con cuentas altas de leucocitos o plaquetas, pueden ocurrir cambios drásticos después de la flebotomía. Las plaquetas liberan potasio de su citoplasma durante la formación del coágulo; esto causa que la concentración de potasio en suero sea más alta que en el plasma. Aunque los individuos normales tienen una diferencia de 0.2-0.3 mmol/L entre el potasio sérico y el plasmático, estas diferencias aumentan en un promedio de 0.15 mmol/L por cada incremento de 100,000/mm en la cuenta de plaquetas.^{ref(113)} Debido a que los leucocitos son más activos metabólicamente que los eritrocitos, los cambios resultantes de una separación retardada son totalmente exagerados en pacientes con leucemia. La concentración de glucosa puede disminuir y la concentración de potasio puede empezar a elevarse en un tiempo tan corto como 30 minutos,^{ref(114)} y el pH puede disminuir cerca de 0.6

unidades en 10 minutos si la muestra no se pone rápidamente en un recipiente con hielo. En pacientes con leucemia linfocítica, la heparina parece inducir la degeneración de linfocitos in vitro, conduciendo a una rápida elevación de la concentración de potasio^{ref(115)} en plasma (pero no en suero) como se muestra en la Fig. 3-7.

Procedimiento para minimizar errores en el procesamiento de muestras.

La manera más efectiva para minimizar errores en el procesamiento de la muestra, es la centrifugación de las muestras que requieren separación tan pronto como sea posible. Si se usan tubos sin ningún tipo de aditivo o anticoagulante, la centrifugación debe ser realizada por lo menos hasta que haya transcurrido media hora después de la extracción de sangre para permitir la formación completa del coágulo. Los tubos con aceleradores del coágulo o anticoagulantes pueden ser separados inmediatamente para prevenir cambios en la muestra. Después de la centrifugación, en muestras sin gel, el plasma o suero debe ser separado de las células tan pronto como sea posible para evitar cambios en la muestra.

Almacenamiento de muestras

Errores originados debidos al almacenamiento inadecuado de muestras.

Una vez que el suero o plasma ha sido separado de las células, la mayoría de las sustancias muestran pequeños cambios en la concentración en un período de 2-3 días cuando se mantienen a 4° C. Para compuestos analizados lábiles, incluyendo, enzimas como la creatina cinasa y lactato deshidrogenasa, la mayoría de las hormonas polipeptídicas, y algunas otras sustancias, las muestras deben ser congeladas para prevenir cambios relacionados con el almacenamiento. Los compuestos analizados que pueden ser intrínsecamente estables en almacenamiento pueden cambiar en presencia de otros compuestos. Por ejemplo, la concentración de triglicéridos disminuye en el suero obtenido de pacientes que toman heparina, aparentemente por la activación de la lipoproteína lipasa.^{ref(116)} Antibióticos aminoglucósidos, tales como la tobramicina y gentamicina, son estables cuando se almacenan a temperaturas de refrigeración a menos que el suero también contenga ciertas penicilinas sintéticas, principalmente piperacilina; las concentraciones de aminoglucósidos pueden disminuir a menos del 50% su valor basal a las 72 horas, cuando ambos medicamentos están presentes.^{ref(117)}

La Evaporación puede incrementar la concentración de la muestra. Cuando una muestra no está cubierta, la velocidad de evaporación es afectada por la temperatura, humedad, movimiento del aire, y el área superficial de la muestra.^{ref(118)} Si la humedad es baja (una situación frecuentemente encontrada en laboratorios con aire acondicionado), hay una relación lineal entre la temperatura y la velocidad de evaporación; sin embargo, con alta humedad, los cambios de temperatura tienen un efecto mínimo en la velocidad de evaporación. Uno de los factores más importantes que afectan la evaporación es la velocidad del movimiento del aire sobre la superficie de un líquido. Para cualquier velocidad dada de flujo de aire, el incremento en la altura de la columna de aire sobre la muestra o la reducción área de apertura del recipiente que contiene la muestra, disminuirá la velocidad de evaporación y decrecerá el movimiento de aire sobre la muestra. En las copas de muestra pequeñas completamente llenas, puede ocurrir hasta un 50% de pérdida de agua en pocas horas. Como en cualquier otra forma de hemoconcentración, esto conducirá a un incremento en la



concentración de proteínas y sustancias unidas a proteínas; aunque también la evaporación incrementa la concentración de otros solutos.

Procedimientos para minimizar errores por almacenamiento.

Los errores por almacenamiento pueden ser evitados seleccionando adecuadamente la hora, temperatura, y condiciones de almacenamiento. La mayoría de los compuestos analizados son estables cuando se almacenan refrigerados hasta por 72 horas. Si un compuesto analizado no es estable, las muestras deben ser congeladas, hasta su análisis. La mayoría de especímenes pueden almacenarse a -70°C sin que sean afectadas las concentraciones de los compuestos analizados, más cuando sean congelados por varios años. [ref\(119\)](#) La actividad de fosfatasa alcalina puede incrementarse con la congelación, aparentemente como resultado de la destrucción de un inhibidor. A las temperaturas estándares de congelación de -10° a -20°C , la mayoría de las sustancias serán estables por períodos más cortos. Debe evitarse la descongelación y recongelación repetidas de muestras; esto es especialmente problemático con los congeladores modernos "libres de escarcha", los cuales periódicamente incrementan la temperatura de congelación para permitir la fusión de la escarcha. Los compuestos analizados que son susceptibles a ciclos repetidos de congelación y descongelación, como el complemento, deben ser almacenados en otro tipo de congeladores. Las muestras congeladas deben ser descongeladas lentamente a temperatura ambiente o en un baño de agua a 37°C , y entonces ser mezcladas meticulosamente antes de su análisis.

Para evitar la evaporación, las muestras deben ser almacenadas con tapa y mantenidas, si es posible, lejos de las áreas de flujo rápido de aire. Cuando sea posible, hay que usar recipientes con pequeña área de superficie y una columna de aire grande sobre la muestra para minimizar la evaporación. La identificación de cada muestra debe ser confirmada en cada una de las etapas de operación para minimizar la posibilidad de confundir los especímenes. Sin embargo, el muestreo directo a partir el tubo de colecta es el mejor camino para minimizar tales errores, especialmente si se cuenta con etiquetas que tienen código de barras y los lectores correspondientes.

Otros Aspectos Preanalíticos de la Colecta de Muestras

Colecta de orina: fuentes de variación

Variables biológicas.

La variación preanalítica en la orina es algo difícil de controlar. Mientras que los cambios en concentración del suero están relacionados con el grado de hemoconcentración, la variación en orina puede ser causada por varios factores. La variable más importante en la determinación de la concentración urinaria de una sustancia es la cantidad relativa de agua excretada. El cuerpo es capaz de alterar marcadamente la concentración urinaria para satisfacer las necesidades de excreción y conservación de agua. Ya que la mayoría de solutos en orina están compuestos por productos de desecho como la urea y creatinina, la osmolalidad de la orina es una medida de la excreción relativa de agua. Los individuos sanos pueden tener una osmolalidad urinaria dentro de un rango de 75 a 1200 mOsm/kg; la concentración relativa de otros solutos, por consiguiente puede variar alrededor de 15 veces. Como se discutió antes en la variación al azar, la variación intraindividual en concentración de orina es, en

promedio, varias veces más alta que la variación intraindividual para los mismos compuestos analizados en suero.^{ref(120)} Controlando el grado de hidratación de los pacientes durante el proceso de colecta de orina se puede minimizar la fuente de variabilidad.

Otras causas de variación preanalítica también afectan las mediciones de orina. Existe una *variación diurna* independiente de la concentración relativa de varias sustancias de la orina, principalmente proteínas, sodio y potasio, fosfatos, y hormonas. Parte de la variación diurna en la excreción de proteínas está relacionada con la postura ya que la concentración relativa de proteínas comparada con la de la creatinina, aumenta cuando se está de pie.^{ref(121)} El estrés incrementa la excreción de proteínas; el ejercicio y la fiebre han demostrado ser causa de un incremento transitorio en proteínas.^{ref(122)} Los *cambios dietéticos* en la ingesta de una sustancia, a menudo alterarán la excreción urinaria. La hidroxiprolina, un componente de la colágena, se usa frecuentemente para medir el recambio metabólico del hueso; la gelatina, un componente de muchos alimentos procesados, contiene colágena y puede ser la principal fuente de excreción urinaria de hidroxiprolina.^{ref(123)} La excreción de creatinina es a menudo usada para evaluar la adecuada colecta de orina para un determinado tiempo. Sin embargo, la fluctuación por cortos períodos en la ingestión de proteínas en la dieta altera la excreción de creatinina en orina.^{ref(124)}

Tiempo de colecta.

La variación en las mediciones de orina puede ser el resultado de la colecta inadecuada de una orina de 24 horas. Tales muestras se encuentran dentro de las más difíciles de coleccionar correctamente. Como ya se mencionó, la creatinina en orina a menudo es usada para medir la colecta completa de la orina, y las muestras con mucha o muy poca creatinina son consideradas como provenientes de una incorrecta colecta. Debido a que la excreción de creatinina es relativamente reproducible en un individuo con una dieta estable (con un promedio de variación diaria del 10%, con una pequeña variación diurna), la relación existente entre la concentración de la sustancia de interés y la de creatinina han sido considerada como un medio de proveer una estimación exacta de la excreción urinaria total.^{refs(125)} Esto es especialmente importante para muestras pediátricas, ya que es difícil obtener la cooperación de los niños en las colecciones de orina por tiempo.

Estabilidad de la muestra.

Muchos compuestos que son estables en suero son inestables en orina. Tanto la contaminación bacteriana como el pH bajo pueden producir cambios in vitro en la concentración de muchos compuestos analizados. La colecta de orina en recipientes con varios preservativos ácidos o bases, se requiere comúnmente para evitar tal variación; una discusión más completa sobre preservativos para orina es dada en el Capítulo 57. En general, las sustancias estables como los electrolitos, proteínas, y creatinina pueden ser medidas en muestras de orina sin el uso de preservativos. La adición de ácidos o bases concentradas generalmente no afecta las mediciones de electrolitos y creatinina; sin embargo, un espécimen conteniendo un preservativo apropiado para medir un compuesto analizado, puede ser inadecuado para realizar en la medición de otra sustancia. El almacenamiento de las muestras de orina durante la colecta también puede alterar la concentración de compuestos analizados. Por ejemplo, las porfirinas son inestables cuando son expuestas a la luz, mientras que el calcio puede precipitarse a bajas temperaturas. La mayoría de los elementos formados en la orina,

como los depósitos de material celular, son inestables cuando se almacenan. La refrigeración de muestras de orinas es a menudo usada para evitar crecimiento bacteriano. Sin embargo, la refrigeración, promueve la formación de cristales que se encuentran a temperatura corporal y disminuye la concentración de aquellas sustancias que se han precipitado.

Variación preanalítica en otros fluidos corporales.

La variación preanalítica en otros fluidos corporales no ha sido estudiada en forma extensa. Muchos factores que afectan otras muestras tales como la hemoconcentración, uso del torniquete y estrés no afectan la composición de los fluidos cefalorraquídeo, peritoneal, y sinovial. El retraso en el transporte de los especímenes al laboratorio, generalmente causa pequeños cambios en la composición de fluidos normales, ya que esos especímenes están prácticamente libres de células. Si se requieren las mediciones de compuestos analizados inestables, como lactato glucosa o pH, las muestras deben ser transportadas al laboratorio en agua con hielo para evitar cambios artificiales en la concentración. Para otros fluidos aparte del líquido cefalorraquídeo, es recomendable el uso de un anticoagulante para evitar la formación de coágulos de fibrina, los cuales pueden disminuir artificialmente las cuentas celulares.

Colecta de muestras en infantes

Muestreo capilar.

La venipuntura en infantes y niños pequeños generalmente no es un método aceptable para la obtención de sangre, en ambos casos debido a la dificultad para encontrar una vena y la importancia de preservar venas disponibles para ser usadas en la administración de fluidos intravenosos. La sangre capilar es el espécimen que usualmente está disponible para las pruebas de estos niños. En neonatos, las partes externas de la planta del pie son los sitios preferidos para punción en piel, mientras que los lóbulos de las orejas y los dedos son aceptables en infantes mayores y niños pequeños. La superficie de la piel es entibiada para producir sangre capilar "arterializada"; como se menciono antes, sin embargo, la concordancia con gases sanguíneos arteriales es poca en neonatos, particularmente en infantes prematuros. Es esencial dejar que se seque el antiséptico tópico que se haya usado antes de hacer la punción de la piel, ya que la sangre colectada se mezclará libremente con cualquier líquido remanente en la superficie. La contaminación con antisépticos puede diluir falsamente especímenes y causar hemólisis. Pueden ser de utilidad aplicar una suave presión después de que la piel ha sido puncionada, pero el oprimir el sitio de punción contamina la muestra con fluido tisular.

Debido al pequeño volumen de muestra obtenido y, el alto hematocrito en neonatos, la cantidad de suero o plasma disponible para la prueba es relativamente escasa. Para facilitar la colecta adecuada de especímenes, existen tubos capilares que contienen anticoagulantes o preservativos. El uso de tubos pediátricos con separadores de suero o plasma heparinizado producirá una cantidad mayor de muestra por volumen de sangre obtenida. Sin embargo, la escasa cantidad de muestra a menudo resulta en una área de superficie relativamente grande, haciendo de la evaporación una consideración aún más importante. El control de los factores que causan la evaporación es especialmente importante en muestras pediátricas. Los cambios

relacionados con hemoconcentración, postura, y dietas son relativamente menos importantes en neonatos que en niños mayores o adultos. La magnitud de las variaciones cíclicas en infantes y niños aún se desconocen en una medida.

Colecta de sangre para enfermedades metabólicas.

Cuando los infantes son estudiados para errores innatos del metabolismo, las muestras son colectadas en papel filtro y se transportan a un laboratorio especializado en manchas de sangre seca. Existe poca información sobre los factores preanalíticos específicos relacionados con manchas de sangre; sin embargo, se sabe que algunos factores afectan los resultados de tales pruebas.[ref\(126\)](#) Debido a que tales especímenes son colectados como sangre capilar, se debe tener cuidado de evitar la contaminación con antisépticos que pueden interferir en los ensayos. El papel debe estar completamente saturado en el área de colecta para proveer una cantidad adecuada de muestra. Para muchos errores metabólicos, el estudio no debe hacerse hasta que el infante tenga por lo menos 24 horas después que se le comenzó a alimentar, ya que los productos metabólicos que se acumulan son derivados de los alimentos ingeridos. La obtención especímenes antes de este tiempo, puede producir resultados falsos negativos. Para pruebas que requieren mediciones de actividad enzimática, debe tenerse cuidado en evitar la exposición de los especímenes al calor excesivo durante el proceso de transporte; si los especímenes son enviados por correo, las temperaturas de los buzones pueden ser suficientemente altas para producir resultados artificialmente bajos. Todas las precauciones generales discutidas previamente, tales como prevención de la evaporación y el mal etiquetado, se deben observar cuidadosamente.

Uso de sistemas computarizados para la detección de errores

Los sistemas de computación que ayudan a la detección de errores pueden reducir el número de resultados erróneos que son reportados.[ref\(127\)](#) En muchos sistemas de computación de laboratorio y hospitales, es posible comparar los resultados de un especimen actual con los de muestras previas del mismo paciente (ver Capítulo 18). Tales comparaciones de resultados son llamadas *verificaciones delta*.[ref\(128\)](#) Una revisión delta pueden examinar la variación de los resultados por cantidad o en porcentaje; en algunos sistemas es posible usar un tipo de verificación para los valores a un cierto nivel y otro para niveles de concentración más altos o más bajos. Las pruebas que son particularmente apropiadas para monitorear las verificaciones delta son aquellas que normalmente cambian poco de un día a otro. Algunas de ellas aparecen en la Tabla 3-4. Se puede usar la medición de la velocidad de cambio de un compuesto analizado para mejorar la sensibilidad de detección de errores.[ref\(129\)](#) Las verificaciones delta no deben ser usadas para sustancias que están sujetas a variaciones intraindividuales pronunciadas (ver Tabla 3-4). En la Tabla 3-5 se da una lista de los valores de verificaciones delta usadas en nuestro laboratorio. Aunque las fluctuaciones en los resultados de una prueba pueden ser vistas cuando mucho en un 1% de todos lo especímenes, los resultados de pruebas múltiples que no pasan la revisión delta, son por lo general el resultado ya sea de un cambio significativo en la condición del paciente o de un especimen no representativo. Se puede mejorar la utilidad de las revisiones delta mediante selección de las pruebas que cambian típicamente en paralelo, como ALAT y ASAT o urea y creatinina, (Tabla 3-4).[ref\(130\)](#) Algunos casos comunes de falla en la revisión delta, incluyen la extracción de especímenes de líneas intravenosas, especímenes

contaminados, y especímenes mal identificados. La revisión de tales resultados antes de su reporte puede conducir a una significativa reducción en el reporte de resultados erróneos. En la Fig. 3-8 se presenta un método que puede ser usado para la evaluación de especímenes que no pasan la revisión delta.

Criterio para el rechazo de especímenes

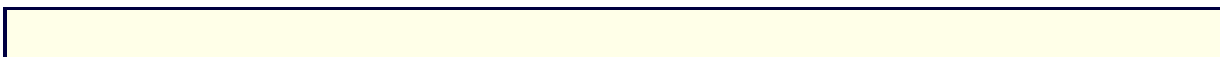
Para evitar el reporte de resultados falsos, cada laboratorio debe establecer el criterio para el rechazo de especímenes. Un espécimen debe ser rechazado cuando los resultados obtenidos en su análisis no representan el estado del paciente. La causa más común de rechazo de un espécimen es una identificación inadecuada. Los especímenes deben tener el nombre del paciente y número de identificación tanto en la muestra como en la requisición. Los especímenes que no son extraídos por el personal del laboratorio deben ser cuidadosamente revisados antes de ser aceptados en el laboratorio. En especímenes que requieren manejo especial, las causas más comunes de rechazo son la colecta y/o transporte inadecuado. La mayoría de los laboratorios que procesan gases sanguíneos, tienen un promedio de un 5% de muestras mal colectadas, y que deben ser rechazadas.^{ref(131)} Con frecuencia los especímenes son colectados en el tubo incorrecto para el ensayo requerido. Cada laboratorio debe tener una lista de muestras alternativas aceptables para cada prueba; por ejemplo, el manual del laboratorio puede sugerir la colecta de suero para una prueba en particular, pero una muestra de plasma heparinizado puede ser una alternativa aceptable. Si las muestras contienen otros anticoagulantes o preservativos, deben ser rechazadas (aunque sea útil para otros análisis). Para tubos que contienen anticoagulantes o preservativos debe haber una proporción entre la muestra y el preservativo. Esto es más crítico con preservativos en soluciones líquidas, pero puede ocurrir también con anticoagulantes en polvo. Los tubos que no tengan la proporción apropiada no deben ser aceptados para análisis. Para pruebas que requieren preparación especial del paciente y ésta no se llevó a cabo, las muestras deben ser rechazadas. Si una prueba es afectada por hemólisis, los especímenes hemolizados deben rechazarse. Si el resultado de una prueba es afectado por lipemia (y la muestra no puede ser clarificada por ultracentrifugación antes del análisis), los resultados de la prueba no deben ser reportados. Finalmente, cualquier resultado que no pase la revisión delta o que sea considerado irreal (potasio mayor de 10 mmol/L, calcio menor de 40 mg/L, etc.), debe ser reportado al director del laboratorio para su verificación antes de ser reportado. Aunque muchos médicos se quejan cuando el laboratorio no les reporta el resultado de las pruebas que ordenaron para sus pacientes, si hay alguna duda acerca de la validez de un resultado este no debe ser reportado. Los resultados erróneos pueden conducir al tratamiento inadecuado del paciente.

Referencias

1. Arendt, J, Minors, DS, and Waterhouse, JM (eds): *Biological rhythms in clinical practice*. Boston, Wright, 1989.
2. Liskowsky, DR: Biological rhythms and shift work. *JAMA* 268:3047, 1992.



3. Utiger RD: Melatonin - the hormone of darkness. *N Engl J Med* 327:1377-1379, 1992.
4. Fevre-Montage, M, Van Cauter, E, Refetoff, S, Deshir, D, Tourniaire, J, and Copinschi, G: Effects of "jet lag" on hormonal patterns. II. Adaptation of melatonin circadian periodicity. *J Clin Endocrinol Metab* 52:642-649, 1978.
5. Tietz, NW: Clinical guide to laboratory tests, 2nd edition. Philadelphia, WB Saunders, 1990.
6. Benvenuti, M, Legnaioli, M, Melone, F, Taddei, I, and Tarquini, B: Circadian rhythm in prostatic acid phosphatase (PAP): a potential tumor marker rhythm in prostatic cancer (PCa). *Chronobiologia* 10: 383, 1983.
7. Kemp, GJ, Blumsohn, A, and Morris, BW: Circadian changes in plasma phosphate concentration, urinary phosphate excretion, and cellular phosphate shifts. *Clin Chem* 38:400-402, 1992.
8. Dufour, DR: Reference values in endocrinology. in Becker, KL (*ibid*), 1723-1761.
9. Rosen, JF, and Chesney, RW: Circulating calcitriol concentrations in health and disease. *J Pediatr* 103:1-17, 1983.
10. Elomaa, I, Karonen, S-L, Karianto, A-L, and Pelkonen, R: Seasonal variation of urinary calcium and oxalate excretion, serum 25(OH)D3, and albumin level in relation to renal stone formation. *Scand J Urol Nephrol* 16:152-161, 1982.
11. Harrup, JS, Ashwell K, and Hopton MR: Circannual and within-individual variation of thyroid function tests in normal subjects. *Ann Clin Biochem* 22 (Pt 4):371-375, 1985.
12. Fraser, CG: Biological variation in clinical chemistry - an update: collated data, 1988-1991. *Arch Pathol Lab Med* 116:916-923, 1992.
- 12a. Fraser, CG: The application of theoretical goals based on biological variation data in proficiency testing. *Arch Pathol Lab Med* 112:404-415, 1988.
13. Statland, BE, Winkel, P, and Bokelund, H: Factors contributing to intra-individual variation of serum constituents: 2. effects of exercise and diet on variation of serum constituents in healthy subjects. *Clin Chem* 19:1380-1383, 1973.
14. Stansbie, D, and Bedley, JP: Biochemical consequences of exercise. *JIFCC* 3:87-91, 1991.
15. Ronkainen, H: Depressed follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, and prolactin responses to luteinizing hormone-releasing hormone-releasing hormone, thyrotropin-releasing hormone, and metoclopramide test in endurance runners in the hard training season. *Fertil Steril* 44:755-759, 1985.
16. Ahlquist, DA, McGill, DB, Schwartz, S, Taylor, WF, Ellefson, M, and Owen, RA: HemoQuant, a new quantitative assay for fecal hemoglobin. Comparison with Hemocult. *Ann Intern Med* 101:297-302, 1984.
17. Perrone, RD, Madias, NE, and Levey, AS: Serum creatinine as an index of renal function: new insights into old concepts. *Clin Chem* 38:1933-1953, 1992.
18. Muldoon, MF, Bachen, EA, Mannuck, SB, Waldstein, SR, Bricker, PL, and Bennett, JA: Acute cholesterol responses to mental stress and change in posture. *Arch Intern Med* 152:775-780, 1992.
19. Genest, JJ, McNamara, JR, Ordovas, JM, et al: Effect of elective hospitalization on plasma lipoprotein cholesterol and apolipoproteins AI, B, and LP(a). *Am J Cardiol* 65:677-679, 1990.
20. Gore, JM, Goldberg RJ, Matsumoto AS, et al: Validity of serum total cholesterol level obtained within 24 hours of acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 54:722-725, 1984.
21. Gebhart, SP, Watts, NB, Clark, RV, Umpierrez, G, and Sgoutas, D: Reversible impairment of gonadotropin secretion in critical illness. Observations in postmenopausal women. *Arch Intern Med* 149:1637-1641, 1989.
22. Kaptein, EM, Grieb, DA, Spencer, CA, Wheeler, WS, and Nicoloff, JT: Thyroxine metabolism in the low thyroxine state of critical nonthyroidal illnesses. *J Clin Endocrinol Metab* 53:764-771, 1981.
23. Davenport, MW, and Zipser, RD: Association of hypotension with hyperreninemic hypoaldosteronism in the critically ill patient. *Arch Intern Med* 143:735-737, 1983.
24. Statland, BE, Bokelund, H, and Winkel, P: Factors contributing to intra-individual variation of serum constituents: 4. effects of posture and tourniquet application on variation of serum constituents in healthy



- subjects. *Clin Chem* 20:1513-1519, 1974.
25. Van Cauter, E: Endocrine rhythms. in Becker, KL (ed): *Principles and practice of endocrinology*. Philadelphia, JB Lippincott, 1990, 45-52.
 26. National Committee for Clinical Laboratory Standards: *Approved standard procedures for the collection of diagnostic blood specimens by skin puncture*. Villanova, Pa, 1982.
 27. College of American Pathologists: *So you're going to collect a blood specimen*, 5th Ed. Danville, IL, Interstate Printers, 1992.
 28. Pendergraph, GA: *Handbook of phlebotomy*, 2nd ed. Philadelphia, Lea and Febiger, 1988.
 29. Hill, BM, Laessig, RH, Koch, DD, and Hassemer, DJ: Comparison of plastic vs. glass evacuated serum-separator (SST) blood-drawing tubes for common clinical chemistry determinations. *Clin Chem* 38:1474-1478, 1992.
 30. Adrogué, HJ, Rashad, MN, Gorin, AB, Yacoub, J, and Madias, NE: Assessing acid-base status in circulatory failure. Differences between arterial and central venous blood. *N Engl J Med* 320:1312-1316, 1989.
 31. Atkin, S, Dasmahapatra, A, Jaker, MA, et al: Fingertstick glucose determination in shock. *Ann Intern Med* 114:1020-1024, 1991.
 32. Irjala, K, Koskinen, P, Nanto, V, and Peltola, O: Interpretation of oral glucose tolerance test: capillary-venous difference in blood glucose and the effect of analytical method. *Scand J Clin Lab Invest* 46:307-313, 1986.
 33. Dumas, BT, Hause, LL, Simuncak, DM, and Breitenfeld, D: Differences between values for plasma and serum in tests performed in the Ektachem 700 XR analyzer, and evaluation of "plasma separator tubes (PST)". *Clin Chem* 35:151-153, 1989.
 34. Don, BR, Sebastian, A, Cheitlin, M, Christiansen, M, and Schambelan, M: Pseudohyperkalemia caused by fist clenching during phlebotomy. *N Engl J Med* 322:1290-1292, 1990.
 35. Weilert, M, Tilzer, LL: Putting bar codes to work for improved patient care. *Clin Lab Med* 11:227-238, 1991.
 36. National Institute on Drug Abuse: *Urinalysis collection handbook for federal drug testing programs*. Washington, US Department of Health and Human Services, 1988.
 37. Sazama K, Robertson, EA, and Chesler, RA: Is routine antiglycolysis required for routine glucose analysis? *Clin Chem* 25: 1086-1087, 1979.
 38. Sealey, JE: Plasma renin activity and plasma prorenin assays. *Clin Chem* 37:1811-1819, 1991.
 39. Howanitz, PJ, Steindel, SJ, Cembrowski, GS, and Long, TA: Emergency department stat test turnaround times. A College of American Pathologists' Q-probes study for potassium and hemoglobin. *Arch Pathol Lab Med* 116:122-128, 1992.
 40. Graber, M, Subramani, K, Corish, D, and Schwab, A: Thrombocytosis elevates serum potassium. *Am J Kidney Dis* 12:116-120, 1988.
 41. Ringelhann, B, Laszlo, E, and Vajda, L: Pseudohyperkalaemia in acute myeloid leukemia. *Lancet* 1:928, 1974.
 42. Dufour, DR, Mesonero, C, and Miller, K: Artifactual hyperkalemia induced by heparin in patients with extreme leukocytosis. *Clin Chem* 33:914, 1987.
 43. Hortin, G, Cole, TG, Gibson, DW, and Kessler, G: Decreased stability of triglycerides and increased free glycerol in serum from heparin-treated patients. *Clin Chem* 34:1847-1849, 1988.
 44. Pickering, LK, and Rutherford, I: Effect of concentration and time upon inactivation of tobramycin, gentamicin, netilmicin, and amikacin by azlocillin, carbenicillin, mecillinam, mezlocillin and piperacillin. *J Pharmacol Exp Ther* 217:345-349, 1981.
 45. Burtis, CA: The effects of temperature and evaporation on analytical error in the clinical laboratory. *Clinical Lab Ann* 1:1-35, 1982.
 46. DiMagno, EP, Corle, D, O'Brien, JF, Masnyk, IJ, Go, VLW, and Aamodt, R: Effect of long-term freezer storage, thawing, and refreezing on selected constituents of serum. *Mayo Clin Proc* 64:1226-1234, 1989.



47. Howey, JEA, Browning, MCK, and Fraser, CG: Selecting the optimum specimen for assessing slight albuminuria, and a strategy for clinical investigation: novel uses of data on biological variation. *Clin Chem* 33:2034-2038, 1987.
48. Clerico, A, Giammattei, C, Cecchini, L, et al: Exercise-induced proteinuria in well-trained athletes. *Clin Chem* 36:562-564, 1990.
49. Yoneyama, K, Ishigure, S, Ikeda, J, and Nagata, H: The day to day variations of urinary hydroxyproline and creatinine excretions, and dietary protein intake. *Nippon Eiseigaku Zasshi* 39:587-594, 1984.
50. Ginsberg JM, Chang BS, Matarese RE, and Garella, S: Use of single voided urine samples to estimate quantitative proteinuria. *N Engl J Med* 309:1543-1546, 1983.
51. Huikeshoven, FJM, and Zuiderhoudt, FMJ: Hypocalciuria in hypertensive disorder in pregnancy and how to measure it. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 36:81-85, 1990.
52. Buist, NRM: Laboratory aspects of newborn screening for metabolic disorders. *Lab Med* 19:145-150, 1988.
53. Ladenson, JH: Patients as their own controls: use of the computer to identify "laboratory error". *Clin Chem* 21:1648-1653, 1975.
54. Sher, PP: An evaluation of the detection capacity of a computer-assisted real-time delta check system. *Clin Chem* 25:870-872, 1979.
55. Lacher, DA, and Connelly, DP: Rate and delta checks compared for selected chemistry tests. *Clin Chem* 34:1966-1970, 1988.
56. Lacher, DA: Relationship between delta checks for selected chemistry tests. *Clin Chem* 36:2134-2136, 1990.
57. Shapiro, BA, Harrison, RA, Cane, RD, and Kozlowski-Templin, R: Clinical application of blood gases, 4th ed. Chicago, Year Book Medical Publishers, 1989, 274-275.

Tablas

Tabla 3-1. Variación intraindividual en pruebas comunes de laboratorio. [refs\(132\)](#)

Suero de prueba	Medio%	Intervalo%
Alanina aminotransferasa	20	5-30
Albumina	2.5	1.5-4
Fosfatasa alcalina	7	5-10
Amilasa	9	5-12
Aspartato aminotransferasae	8	5-12
Bilirrubina, total	19	13-30
Calcio, total	2	1-3
Cloro	1.2	1.1-1.3
Colesterol, HDL	6	3-9
Creatinina	5	3-8
Ferritina	10	5-18
Glucosa, en ayunas	10	5-13
Hierro	15	10-25
Lactato dehidrogenasa	10	8-13
Magnesio	4	3-5
Osmolalidad	1	1-2
Fosfato	8	5-10
Potasio	3	1-5

Proteínas, totales	2	2-3.5
Sodio	0.6	0.5-1
Tirotropina (TSH)	18	15-20
Tiroxina	5	4-7
Triglicéridos	20	15-30
Urea (BUN)	10	5-17
Ácido úrico	7	5-10

Tabla 3-2. Indicaciones para los anticoagulantes y preservativos mas comúnmente usados.

Muestras Aplicación	Tipo de anticoagulante o preservativo	Base química del anticoagulante o preservativo
Sangre total	EDTA*	Unión al calcio
Hematología	Heparina de sodio	libre de plomo
Plomo	Citrato de sodio	Unión al calcio
Plasma	Heparina**	Inhibe la trombina
Coagulación	Oxalatos	Unión al calcio
Bioquímica	Ninguno	Ninguno
Coagulación	Ninguno	Libre de
Suero		contaminantes
Bioquímica	Separador de suero	Barrera de gel
Elementos	Trombina	Aumenta la velocidad
traza		de coagulación
Bioquímica de	Antiglucolíticos	
emergencia	Yodoacetato	Inhibe el gliceraldehido
Agentes		3- fosfato
Suero		deshidrogenasa
Glucosa, ácido	Fluoruro/oxalato	Inhibe la enolasa
láctico		
Plasma parcial		
Glucosa		
*se obtiene como Na ⁺ o sales de K ⁺		
** se obtiene como Na ⁺ , LI ⁺ o sales NH ₄ ⁺		

Tabla 3-3. Efecto de las variables en el manejo de especímenes la medición de gases sanguíneos.

Factor no controlado	pH	PO ₂	PCO ₂
El espécimen no fue sumergido en agua con hielo		Disminuye hasta 0.01 en 10 minutos	Disminuye hasta 5% en 10 minutos
Burbujas de aire que no se retiraron		Aumenta la muestra si se agita	Aumenta ligeramente, disminuye en pacientes con PO ₂ inicial alto
Exceso de heparina líquida adicionada		Disminuye con algunas formas; en general no hay efecto	Aumenta ligeramente, disminuye en pacientes con inicial PO ₂ alto

Tabla 3-4. Revisiones delta para análisis.

Apropiado	Inapropiado
Electrolitos; Na, K, Cl	Glucosa
Proteína Total	Fosfato
Albumina	Lactato
Deshidrogenasa	
Urea	Creatina cinasa
Creatinina	Aspartato
Aminotransferasa	
Fosfatasa Alcalina	Alanina
Aminotransferasa	
Hemoglobina y hematocrito; MCV y amplitud de la distribución de las células rojas	

Tabla 3-5. Valores de revisión delta.

Prueba	Valor de revisión delta
Albumina	10 g/L
Brecha aniónica	10 mmol/L
Calcio	10 mg/L
Cloro	5 mmol/L
Colesterol	±30%

Contenido de CO ₂	5 mmol/L
Creatinina	±50%
Bilirrubina directa	±50%
Glucosa (solo en ayunas)	±30%
Magnesio	0.25 mmol/L
Volumen medio corpuscular	4 µm ³
Volumen medio de plaquetas	1.5 µm ³
Osmolalidad	15 mosm/kg
Potasio	1 mmol/L
Proteínas	10 g/L
Amplitud de la distribución de células rojas	2 % (cambio absoluto)
Sodio	5 mmol/L
Bilirrubina total	±50%
Nitrógeno úrico	±50%
Ácido urico	15 mg/L

Figuras

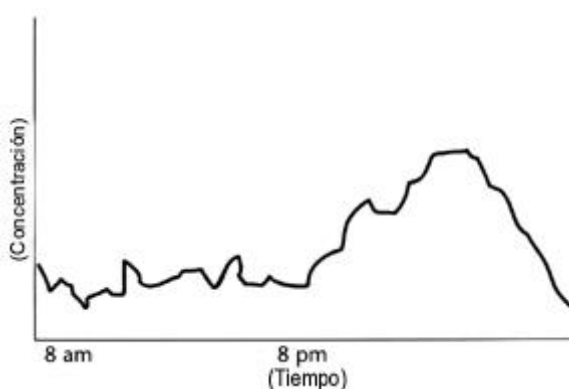


Figura 3-1

Patrones diurno y ultradiano de liberación de hormonas. La mayoría de hormonas pituitarias muestran una pronunciada variación diurna, con niveles generalmente más altos durante la noche que durante el día. Algunas hormonas, tales como la del crecimiento (ilustrada aquí), son liberadas en episodios bruscos durante el día. Un solo resultado al azar es difícil de interpretar, porque puede representar un pico, una depresión, o un punto intermedio.

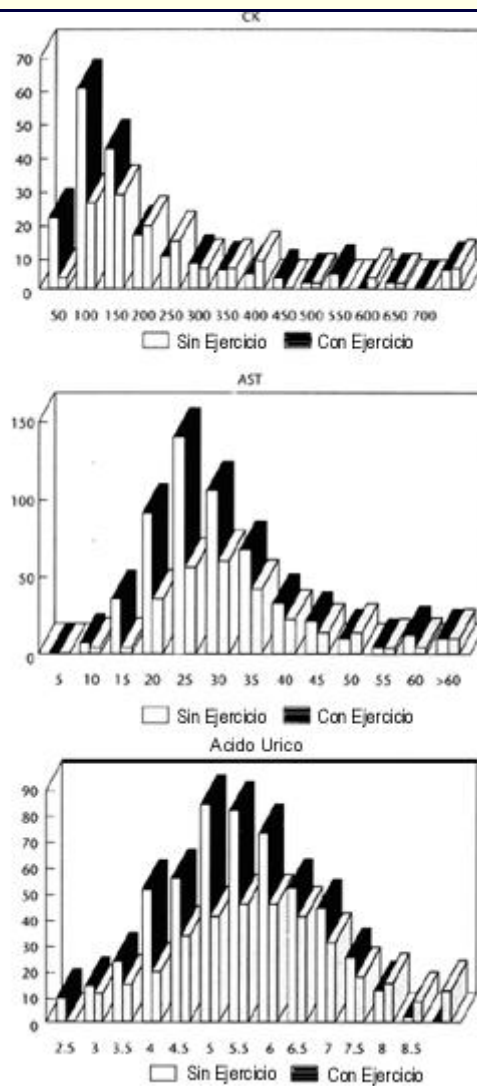


Figura 3-2. El efecto del ejercicio en los resultados de las pruebas de laboratorio. Datos de 750 estudiantes de medicina, muestra que el ejercicio esta asociado con un cambio o desviación en la distribución de resultados hacia valores más altos (distribuidos en el eje de las x; y el eje de las y representa el número de estudiantes).

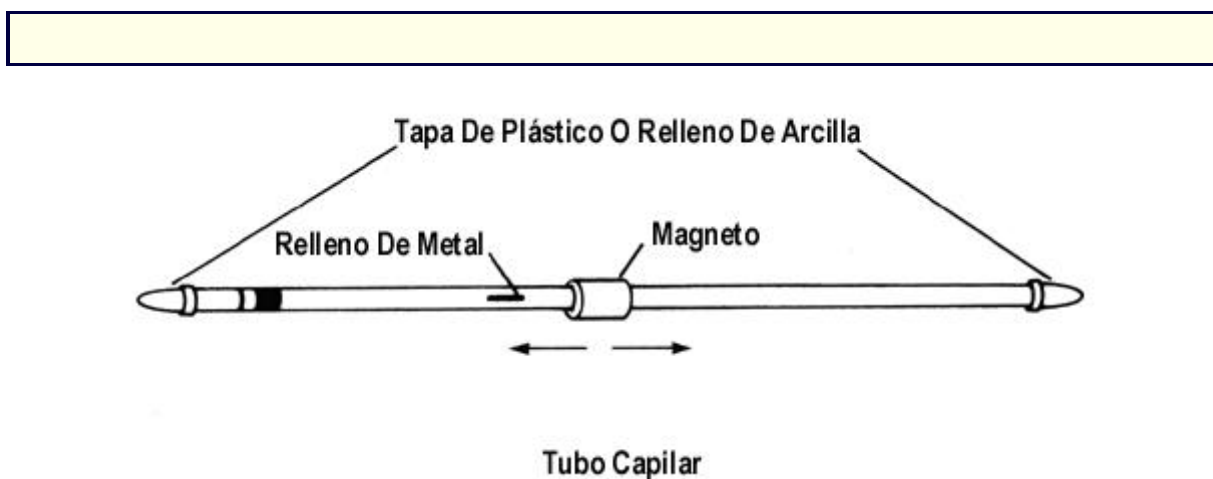


Figura 3-3. Representación esquemática de tubos capilares heparinizados. El imán se usa para mover el metal que esta dentro del tubo sellado a fin de mezclar la muestra con heparina y, posteriormente, volver a mezclar la muestra antes de someterla al análisis.

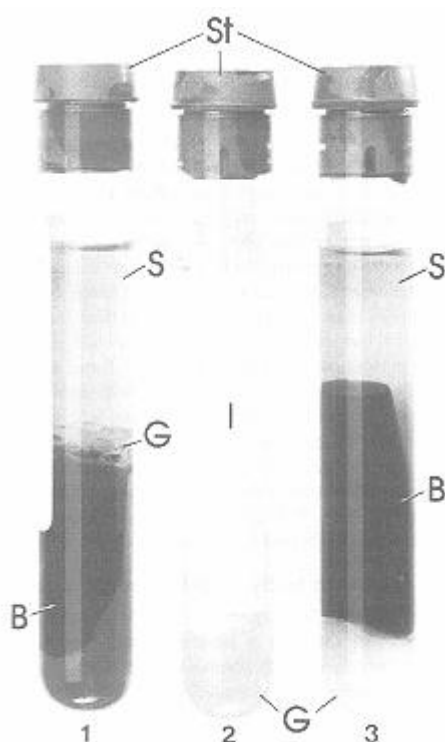


Figura 3-4. Tubos de flebotomía vacutainer que contienen gel de barrera (tapones rojo/gris). 1, Tubo llenado con sangre y centrifugado; 2, Tubo sin llenar; y 3, Tubo llenado con sangre y sin centrifugar. Advierta las posiciones del gel antes (3) y después de la centrifugación (1). B, Sangre coagulada; St, tapones rojo/gris; G, gel de barrera; S, suero

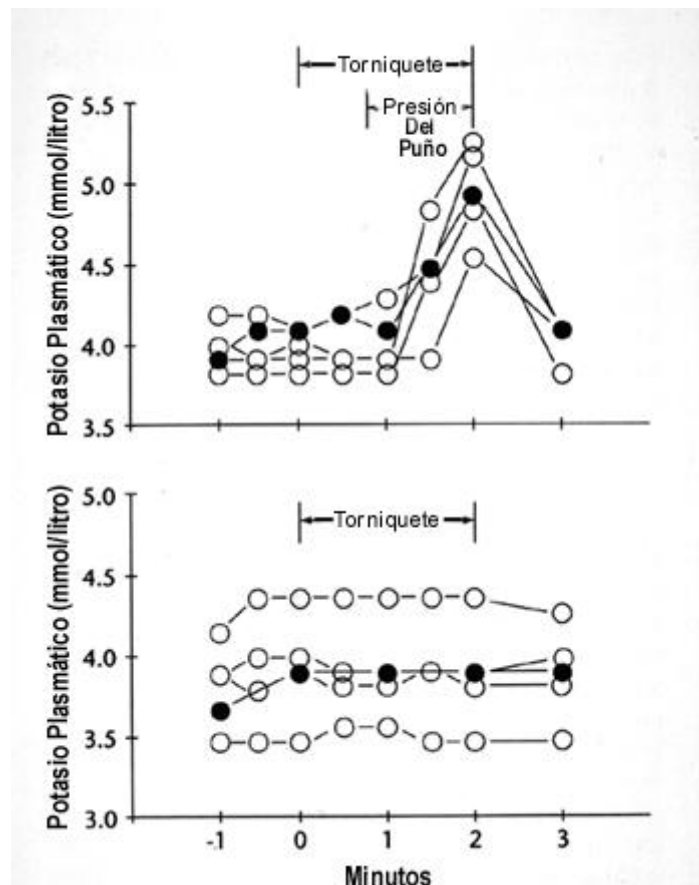
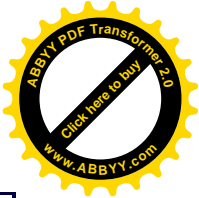


Figura 3-5. Efectos que ocurren en la concentración plasmática de sodio al aplicar un torniquete y apretar el puño (panel superior) efecto al usar solamente el torniquete (panel inferior). Los círculos negros representan el paciente y los círculos blancos los sujetos de control. La aplicación sola del torniquete no tiene ningún efecto en los niveles de potasio, mientras que al cerrar el puño resulta en un fuerte incremento en los niveles tanto del paciente como los sujetos de control (De: Don BR, Sebastian A, Cheitlin M, et al: N Engl J Med 322:1291, 1990.)



TOXICOLOGY LABORATORY		
Chain of Evidence Form		
SUBJECT NAME _____ SUBJECT SOCIAL SEC. # _____		
DATE/TIME OF COLLECTION _____ COLLECTED BY _____		
NUMBER OF SPECIMENS _____ TYPE OF SPECIMEN: _____ BLOOD _____ SERUM _____ URINE		
WITNESS _____		
Sent By Name/Date/Time	Received By Name/Date/Time	Condition of Seals
1. _____	_____	_____
2. _____	_____	_____
3. _____	_____	_____
4. _____	_____	_____
5. _____	_____	_____
Specimen Opened for Testing Name/Date/Time	Witnessed By Name/Date/Time	Condition of Seals
A. Outside Package 6. _____	_____	_____
B. Specimen 7. _____	_____	_____
LABORATORY ACCESSION NUMBER: _____		
This form must remain with the specimen until line #7 is complete. At that time the form should be turned over to the laboratory supervisor or the designate for filing.		

Figura 3-6. Ejemplo de una forma para la cadena de custodia. (De: Pesce AJ, Kaplan LA: In Methods in Clinical Chemistry, St Louis, 1987, Mosby)

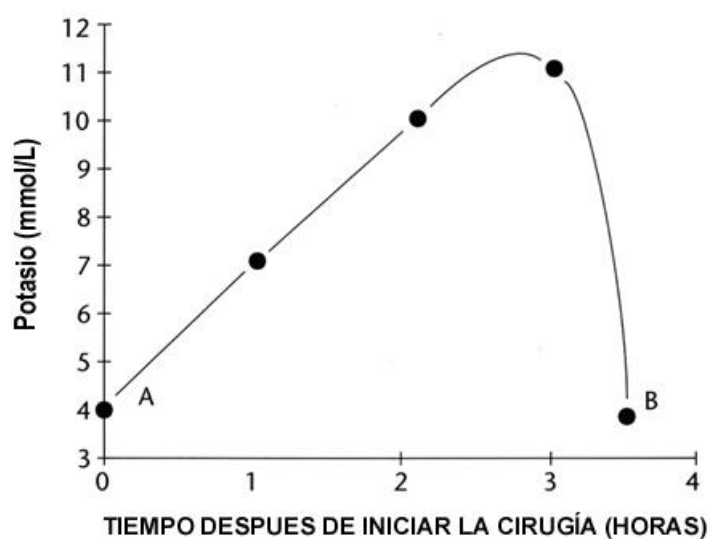


Figura 3-7. Efecto de heparina en el potasio en leucemia linfocítica. La gráfica representa la concentración de potasio en "suero" obtenida durante la cirugía para retirar el bazo en un paciente con leucemia linfocítica crónica con una cuenta de leucocitos de $350,000/\text{mm}^3$. El punto A representa potasio preoperatorio en suero. Los siguientes tres puntos representan los especímenes obtenidos a través de un catéter arterial conteniendo heparina después de 1, 2, y 3.5 horas de iniciada la cirugía. El punto B representa el potasio en suero obtenido del brazo opuesto al catéter arterial 15 minutos después del espécimen previo con un potasio en "suero" de 11.2 mmol/L.

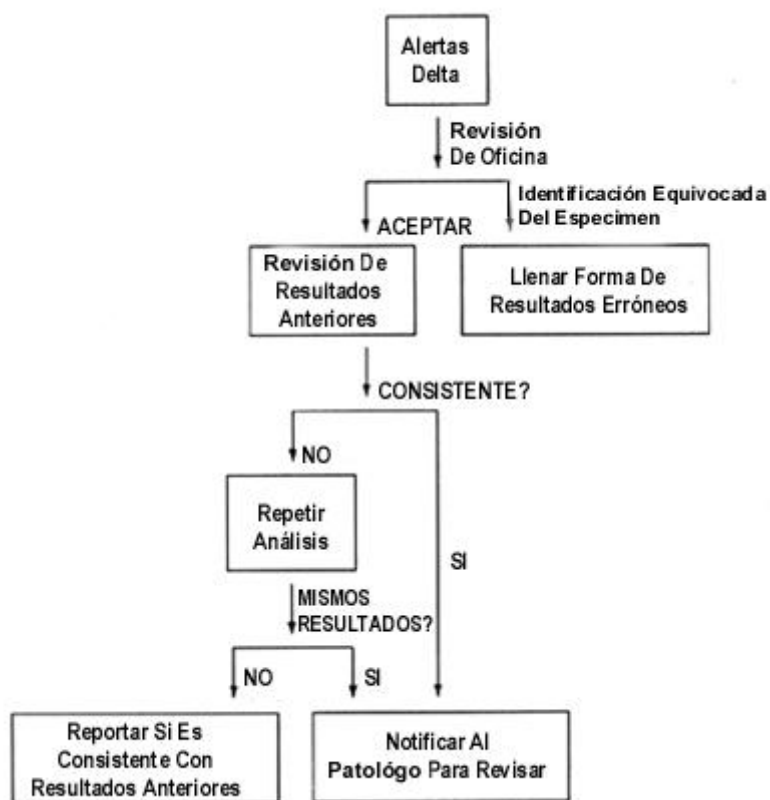


Figura 3-8. Diagrama de flujo de las alertas delta.

CAPÍTULO 4



4. Técnicas Espectrales

Amadeo J. Pesce

Christopher S. Frings

Jack Gauldie

Luz y materia

Propiedades de la luz y la energía radiante

Interacciones de la luz con la materia.

Espectroscopía de absorción

Absorción de energía radiante

Ley de Lambert y Beer

Instrumentación

Rendimiento del instrumento

Selección de las condiciones óptimas y sus limitaciones

Pruebas para el control de calidad de los espectrofotómetros

Espectrofotometría de reflectancia

Registrando la espectrofotometría espectral.

Absorción atómica

Fundamento

Instrumentación

Fuentes de error

Fotometría de llama

Fundamento

Fluorometría

Fundamento

Instrumentación

Limitaciones

Fluorescencia de resolución tardía

Quimioluminiscencia

Fluorescencia de polarización.

Nefelometría y turbidimetría

Fundamentos

Instrumentación

Limitaciones: turbidimetría frente a la nefelometría.

Refractometría

Fundamento

Aplicaciones

Interferencias

Instrumentación.



OBJETIVOS

- Describir las relaciones entre longitud de onda, frecuencia, energía y el color del espectro visible y ultravioleta.
- Describir las relaciones entre porcentaje de transmitancia (%T) y absorbancia (A). Como afecta esta relación el color de una solución.
- Describir la Ley de Lambert-Beer y sus limitaciones.
- Mostrar la construcción y funcionamiento de monocromadores fotométricos y detectores; explicar las ventajas y desventajas asociadas con el uso de cada uno de los instrumentos espectrales. Además describir los principios de aislamiento espectral y ancho de banda.
- Trazar un diagrama de los componentes esenciales del espectrofotómetro de absorción atómica y del fluorómetro.
- Mencionar el principio de funcionamiento, clarificar las similitudes y diferencias.
- Explicar las interferencias asociadas con cada uno.
- Describir como la instrumentación y los fundamentos básicos de fotometría son modificados con las aplicaciones en: turbidimetría, nefelometría o fluorometría e identificar cada una de las interferencias o fuentes de error asociadas con cada una.
- Describir una de las reacciones químicas que se produce en quimioluminiscencia.
- Comparar y diferenciar los principios espectroscópicos de absorción y emisión.

Términos clave

absorbancia Definida como $2 - \log \%T$, es directamente proporcional a la concentración de las sustancias absorbentes si se sigue la ley de Beer.

absorción atómica sin llama Técnica de absorción atómica en la cual el elemento es transformado a la fase gaseosa sin el uso de llama.

absorción molar (e) Absorbancia de luz a una longitud de onda específica dividida entre el producto de la concentración en moles por litro y la longitud del camino óptico de la muestra en centímetros. La absorción molar se expresa como L/mol.cm.

absortividad Absorbancia dividida entre el producto de la concentración de una sustancia y la longitud del paso de luz de una muestra.

ancho de banda Intervalo de longitudes de onda que alcanza la abertura de salida de un monocromador; usualmente se define como el intervalo de longitudes de onda a un punto igual a la mitad del máximo (pico) de la intensidad transmitida.

ángulo de detección Ángulo en el cual la luz dispersada es medida en nefelometría.

arreglo de diodos Matriz bidimensional de semiconductores sensibles a la luz, cuya respuesta permite trazar el espectro de absorción completo en milisegundos. (Diode array, en inglés)

bioluminiscencia Catálisis enzimática de una reacción usando moléculas orgánicas complejas y adenosín trifosfato (ATP) para emitir luz.

blanco Solución que contiene todos los componentes incluyendo solutos y solventes, excepto el compuesto a ser medido. Esta solución se utiliza para fijar I_0 , la intensidad de luz original.

cubeta Receptáculo en el cual se coloca la muestra en un fotómetro. También se le denomina *celda*.

dispersión de la luz Interacción de la luz con partículas que provocan la desviación de su



camino original (principio de turbidez).

dispersión de Rayleigh Reflexión de la luz a diferentes ángulos por partículas suspendidas en una solución. Esta dispersión ocurre cuando la longitud de onda de la luz es mayor que el tamaño de las partículas.

espectro de absorción Intervalo de energía electromagnética utilizado en el análisis espectral, incluyendo la luz visible y la radiación ultravioleta; también se le denomina a la gráfica o trazo de un espectro de un compuesto específico.

espectro de línea Espectro discontinuo de emisión de elementos en los cuales las bandas de luz emitidas cubren un intervalo estrecho de energías (0.1 nm).

espectrofotometría de absorción atómica Medida espectroscópica cuantitativa en la cual la luz emitida de una fuente compuesta por un elemento es absorbida por el mismo elemento en fase gaseosa. La cantidad de luz absorbida es directamente proporcional a la concentración del elemento en la muestra.

espectrofotometría de reflectancia Técnica espectrométrica cuantitativa en la cual, la luz reflejada desde una superficie de una reacción colorimétrica es usada para medir la cantidad del producto de la reacción.

espectrofotómetro Instrumento que mide la intensidad de la luz. Compuesto por una fuente de energía radiante, abertura de entrada, monocromador, abertura de salida, soporte de la cubeta, detector y mecanismo de medición. Las mediciones en este instrumento pueden realizarse sobre un intervalo continuo del espectro disponible.

estándar interno Elemento o compuesto añadido en una cantidad conocida para producir una señal frente a la cual podrá calibrarse un instrumento o el compuesto analizado por determinarse.

filtro Dispositivo óptico (generalmente de vidrio) que permite sólo el paso de una porción de la luz policromática incidente. La cantidad de luz transmitida está relacionada con el ancho de banda del filtro.

fluorescencia de resolución tardía Técnica en la cual se mide la fluorescencia lentamente emitida por componentes tales como los metales quelados. Se determinan usualmente entre los 400 y 1000 mseg.

fluorescencia polarizada Orientación de la luz fluorescente emitida, la cual puede ser calculada por la fórmula de polarización.

fluorescencia Luz emitida por un átomo o molécula después de la absorción de un fotón. Esta luz tiene una longitud de onda mayor (menor energía) que la luz absorbida y es usualmente emitida en menos de 10^{-8} segundos. Sin embargo, algunos componentes emiten el fotón a una velocidad más lenta.

fosforescencia Similar a la fluorescencia, luz emitida por un átomo o molécula después de la absorción de un fotón. La luz es usualmente emitida a un tiempo mayor de 10^{-3} segundos después de la absorción de un fotón.

fotodetector Aparato que responde a la luz (fotones) usualmente de manera proporcional al número de fotones que chocan sobre su superficie fotosensible. Generalmente se genera una corriente eléctrica proporcional a la intensidad de la luz incidente.

fotómetro Instrumento que mide la intensidad de la luz, formado por una fuente de energía radiante, un filtro para la selección de longitudes de onda, un soporte para cubeta, un detector, y un mecanismo de medición.

fotón Consiste en una partícula con una carga discreta de energía radiante.

índice de refracción Razón de la velocidad de la luz en dos medios diferentes; generalmente el medio de referencia es el aire.

lámpara de cátodo hueco Lámpara consiste en un cátodo de metal y un gas inerte. Cuando una corriente eléctrica pasa a través del cátodo, el metal es expulsado libremente y luego de chocar con el gas de la lámpara emite un espectro lineal de longitudes de onda específicas relacionadas con el metal del cátodo.

ley de Lambert-Beer (comúnmente conocida como ley de Beer) La concentración de una sustancia es directamente proporcional a la cantidad de energía radiante absorbida.

longitud de onda de emisión Longitud de onda radiante (λ_{em}) utilizada para determinar el decaimiento de las moléculas excitadas en la fluorescencia; se refiere usualmente a la longitud de onda de los fotones de salida medidos en un fluorómetro.

longitud de onda de excitación Longitud de onda de energía radiante (λ_{ex}) que es absorbida por una molécula, que produce su promoción a un estado energético mayor; usualmente se refiere a la longitud de onda de la energía incidente en el fluorómetro.

longitud de onda Distancia lineal atravesada por un ciclo completo de onda de energía electromagnética.

luminiscencia Luz emitida a bajas temperaturas, a menudo como resultado de una reacción química.

luz errática Energía radiante que alcanza el detector y consiste en longitudes de onda distintas a las definidas por el filtro o monocromador.

luz visible Energía radiante en el espectro electromagnético que es visible al ojo humano (aproximadamente de 390 a 780 nm).

monocromador Aparato usado para aislar una cierta longitud de onda o rango de longitudes de onda. Generalmente se refiere a prismas o redes de difracción.

monocromático Luz de un solo color (longitud de onda). En la práctica se refiere a la energía radiante compuesta por un intervalo muy estrecho de longitudes de onda.

nefelometría Técnica que mide la cantidad de luz dispersada por las partículas suspendidas en una solución.

policromático Luz de muchos colores (longitud de onda), usualmente referido a la luz blanca, o que comprende una región definida del espectro.

quimioluminiscencia Reacción química que implica oxidación usualmente, en el cual uno de los productos es luz.

radiación infrarroja Región del espectro electromagnético que se extiende desde 780 a 300,000 nm.

radiación ultravioleta Región del espectro electromagnético entre los 180 a 390 nm.

red de difracción Elemento óptico que consiste en una superficie reflejante de líneas paralelas igualmente espaciadas que dispersa luz policromática en un espectro continuo y uniforme. La dispersión de la luz se atribuye a fenómenos de interferencia en la superficie.

refracción Proceso por el cual el camino de la luz incidente es desviado después que la esta pasa oblicuamente de un medio a otro de diferente densidad.

refractómetro Instrumento para medir el índice de refracción (refractividad) de varias sustancias, especialmente de soluciones.

transición electrónica Cambio de la posición orbital del electrón de un átomo o molécula. En



el caso de la absorción de un fotón de luz, el electrón usualmente va de un nivel de energía más bajo o basal a uno más elevado con un estado de energía mayor (energía aumentada) de la molécula. Es la base del fenómeno de fluorescencia.

Luz y Materia^{refs(133)}

Propiedades de la luz y la energía radiante

La energía radiante electromagnética es una forma de energía que puede describirse en términos de sus propiedades ondulatorias. Las ondas electromagnéticas viajan a grandes velocidades y no se requiere la existencia de un medio de soporte para su propagación.

La longitud de onda, λ , de un rayo de energía radiante electromagnética es la distancia lineal atravesada por un ciclo completo de onda y usualmente se expresa en nanómetros (nm, 10^{-9} metros). La frecuencia, ν , es el número de ciclos que ocurren por segundo y se obtiene por la relación

$$\nu = \frac{c}{\lambda}$$

La velocidad, c , varía con el medio a través del cual atraviesa la energía radiante ($c = 3 \times 10^{10}$ cm/seg cuando se mide en el vacío).

Puede demostrarse que la energía radiante se comporta como si estuviera compuesta de cargas discretas de energía llamada *fonones*. La energía de un fotón es variable y depende de la longitud de onda o frecuencia de la energía radiante. La relación entre la energía, E , de un fotón y la frecuencia está dada por la fórmula

$$E = h\nu$$

h es la constante de Planck y tiene un valor numérico de 6.62×10^{-27} erg.seg. La expresión equivalente que introduce a la longitud de onda es

$$E = \frac{hc}{\lambda}$$

Esta ecuación demuestra que las longitudes de onda corta tienen mucha más energía que las longitudes de onda larga.

El espectro electromagnético abarca un intervalo muy grande de longitudes de onda, como se muestra en la Tabla 4-1. Las áreas del espectro electromagnético utilizadas generalmente en el laboratorio clínico son: el ultravioleta (UV) y las regiones visibles. La región visible está definida como la región entre 390 y 780 nm, mientras que el espectro ultravioleta definido para el laboratorio de química clínica cae entre 180 y 390 nm. La luz solar o la luz emitida por un filamento de tungsteno es una mezcla de energía radiante de diferentes longitudes de onda que el ojo reconoce como “blanco”. La desintegración de la



región visible en color absorbido y color reflejado se ilustra en la Tabla 4-2. Si una solución absorbe energía radiante (luz) entre 400 y 480 nm (azul), *transmitirá* todos los demás colores y aparecerá amarilla al ojo. Por lo tanto el amarillo es el color complementario del color azul. Si se enfoca la luz blanca sobre una solución que absorbe energía entre 505 y 555 nm (verde), la luz transmitida y por consiguiente la solución aparecerá color púrpura (azul y rojo). Si se dirige una luz roja sobre una solución de color rojo, la luz roja será transmitida porque esta solución no puede absorber la luz roja. Por otra parte, si la luz verde se hace incidir sobre una solución de color rojo, no hay luz transmitida, puesto que la solución absorbe toda la luz excepto la roja. El ojo humano responde a la energía radiante entre 390 y 700 nm, pero los instrumentos del laboratorio permiten mediciones del espectro tanto de longitudes de onda corta como la UV y longitudes de onda larga, como el infrarrojo.

Interacciones de la luz con la materia

Proceso de absorción.

Cuando un átomo, ion o molécula absorbe un fotón, la energía agregada produce una alteración del estado, y se dice que las especies están excitadas. La excitación puede involucrar alguno de los siguientes procesos:

1. Transición de un electrón a un nivel mayor de energía.
2. Un cambio en el modo de vibración de las moléculas con enlaces covalentes.
3. Alteración de su modo de rotación alrededor de los enlaces covalentes.

Cada una de estas transiciones requiere una cantidad definida de energía; la probabilidad de que ocurra una determinada transición es mucho mayor cuando el fotón absorbido proporciona dicha cantidad definida de energía.

Los requerimientos de energía para estas transiciones varían ampliamente. Usualmente la promoción de electrones a niveles superiores de energía requiere la absorción de gran cantidad de energía que la requerida para provocar cambios vibracionales. Usualmente las alteraciones en la rotación tienen menores requerimientos energéticos. Por consiguiente, la absorción de energía en la región de microondas e infrarrojo lejano produce transferencias en los niveles de energía de rotación, puesto que la energía de la radiación es insuficiente para ocasionar otros tipos de transiciones. Los cambios en los niveles vibracionales son ocasionados por la absorción en el infrarrojo cercano y las regiones del visible. La promoción de un electrón a un nivel superior de energía ocurre después de la absorción de energía en las regiones del espectro visible, ultravioleta y de rayos X. La energía almacenada por los electrones en los enlaces covalentes varía según la naturaleza de los enlaces. La energía de un fotón de luz necesaria para excitar un electrón variará por lo tanto, con el enlace y cada tipo de enlace tendrá su propio patrón característico de longitudes de onda óptimas de luz que pueden ser absorbidas por ese enlace. La Tabla 4-3 proporciona bandas de absorción de muchos grupos orgánicos.^{ref(134)}

El patrón de absorción de moléculas orgánicas complejas que contienen decenas de miles de enlaces, por lo tanto debe describir la suma acumulativa de la absorción de todos los enlaces covalentes.

La absorción de la energía radiante por una solución puede describirse por medio de una gráfica de absorbancia en función de la longitud de onda. Esta gráfica se denomina *espectro de absorción* (Fig. 4-1). El espectro de absorción refleja la suma de las transiciones



características de energía de una molécula en cada longitud de onda. El espectro de absorción frecuentemente se utiliza para propósitos de identificación cualitativa. Esto es particularmente cierto para energías de baja absorción, como las que se encuentran en la región infrarroja. Independiente de la cantidad de energía absorbida, una especie excitada tiende a regresar espontáneamente a su estado basal o no excitado; en el proceso se libera energía cinética (movimiento), vibracional, o energía luminosa (ver el texto de fluorescencia).

Procesos de emisión.

Algunos elementos y compuestos pueden ser excitados de manera que, cuando el electrón regresa de un estado excitado a uno basal la energía se disipa como energía radiante. La energía radiante consiste en uno o más niveles de energía y por lo tanto en diferentes longitudes de onda. Este principio se aplica en fotometría de llama y métodos fluorométricos, y será discutido más adelante.

Espectroscopía De Absorción^{refs(135)}

Absorción de energía radiante

Considérese un haz de energía radiante con una intensidad inicial, I_0 , que incide sobre una celda cuadrada y pasa a través de ella (cuyos lados son perpendiculares al haz). La celda contiene una solución de un compuesto que absorbe energía radiante de una cierta longitud de onda (Fig. 4-2). La intensidad de la energía radiante transmitida, I_s , será menor que I_0 . Parte de la energía radiante será reflejada por la superficie de la celda o absorbida por la pared de la celda o el solvente. Por lo tanto estos factores deben ser eliminados si se desea considerar sólo la absorción del compuesto de interés. Esto se hace usando un blanco o solución de referencia que contiene todo menos el compuesto a ser determinado. La cantidad de luz que pasa a través de la solución blanco se establece como la nueva I_0 (relativa a la celda de referencia y la solución). La transmitancia de un compuesto en solución se define como la proporción de luz incidente que es transmitida:

$$\text{Transmitancia} = T = I_s / I_0$$

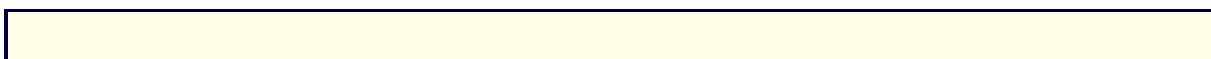
Usualmente esta razón se describe como un porcentaje

$$\text{Porcentaje de } T = \%T = I_s / I_0 \times 100$$

El concepto de transmitancia es importante porque sólo puede medirse la luz transmitida.

Cuando la concentración de un compuesto en solución aumenta, más luz es absorbida por la solución y menos es transmitida. El porcentaje de T varía inversamente y logarítmicamente con la concentración. Sin embargo, es más conveniente usar la absorbancia, A , la cual es directamente proporcional a la concentración. Por lo tanto

$$A = -\log I_s / I_0 = -\log T = \log \frac{1}{T}$$



T

Para convertir T en %T, el denominador y el numerador son multiplicados por 100:

$$A = \log \frac{1}{T} \times \frac{100\%}{100\%} = \log \frac{100\%}{T}$$

Esto puede reorganizarse

$$A = \log 100\% - \log \%T$$

o

$$A = 2 - \log \%T$$

Es importante recordar que la absorbancia no es una cantidad directamente cuantificable, sino que puede ser obtenida por cálculo matemático de los datos de transmitancia.

La relación entre absorbancia y %T se ilustra en la Fig. 4-3, en la cual la escala lineal de %T va de 0 a 100%, mientras que la escala logarítmica de la absorbancia va de infinito a 0.

Ley de Lambert-Beer

La ley de Lambert-Beer (comúnmente conocida como *ley de Beer*) establece que la concentración de una sustancia es directamente proporcional a la cantidad de energía radiante absorbida o inversamente proporcional al logaritmo de la energía radiante transmitida. Si la concentración de una solución es constante y la longitud del paso de luz que atraviesa una solución se duplica, el efecto sobre la absorbancia es igual duplicar la concentración, ya que habrá dos veces más moléculas absorbentes presentes en el paso de energía radiante. De este modo la absorbancia también es directamente proporcional a la longitud de la trayectoria que atraviesa la energía radiante a través de la celda.

La relación matemática entre la absorción de energía radiante, la concentración de la solución, y la longitud del paso óptico se demuestra por la ley de Beer:

$$A = abc$$

A es la absorbancia; *a*, absorptividad; *b*, paso de luz de la solución en centímetros; y *c*, concentración de la sustancia de interés.

Esta ecuación forma las bases del análisis cuantitativo por fotometría de absorción o espectroscopía de absorción. Los valores de absorbancia no tienen unidades. La absorptividad es una constante de proporcionalidad relacionada con la naturaleza química del soluto y tiene unidades que son recíprocas con las de *b* y *c*.

Cuando *c* se expresa en moles por litro y *b* en centímetros, el símbolo ϵ , llamado absorptividad molar, se usa en lugar de *a* y es una constante para un compuesto dado a una determinada longitud de onda, bajo condiciones específicas de solvente, pH, temperatura, etc. Tiene unidades de L/mol.cm. Mientras mayor es la absorptividad molar, mayor es la



absorbancia para la misma concentración en términos de masa de dos compuestos. Por lo tanto, en la selección de un cromógeno para métodos espectrofotométricos, se debe usar un cromógeno con alta absortividad molar, el cual impartirá mayor sensibilidad a la medición.

Una vez probado que el cromógeno sigue la ley de Beer a una longitud de onda específica (es decir, una gráfica lineal de A contra c con intercepto en cero; Fig. 4-4, A), la concentración de una solución desconocida puede ser determinada midiendo su absorbancia e interpolando su concentración en la gráfica de calibración. Por el contrario, cuando el %T se grafica frente a la concentración (en un papel milimetrado), se obtiene una relación curva (Fig. 4-4, B). A causa de la relación lineal entre la absorbancia y la concentración, es posible relacionar concentraciones desconocidas con un calibrador único por una ecuación simple de proporciones. Así

$$\frac{A_u}{A_s} = \frac{C_u}{C_s}$$

y

$$C_u = \frac{A_u}{A_s} \times C_s$$

donde C_u y C_s son las concentraciones de la muestra y el calibrador respectivamente y A_u y A_s son sus respectivas absorbancias.

La ecuación arriba descrita es válida *sólo* si el cromógeno obedece la ley de Beer y tanto el calibrador como la muestra son determinados en la misma celda. El intervalo de concentración sobre el cual el cromógeno obedece la ley de Beer debe determinarse para cada conjunto de condiciones analíticas.

La ley de Beer es una relación matemática ideal que contiene varias limitaciones. Las desviaciones de la ley de Beer, son variaciones en la linealidad de la absorbancia contra la concentración (Fig. 4-5), y ocurren cuando: (1) se miden concentraciones muy elevadas, (2) la energía de la radiación incidente no es monocromática, (3) la absorción del solvente es significativa comparada con la absorbancia del soluto, (4) la energía radiante es transmitida por otros mecanismos (luz errática), y (5) los lados de la celda no son paralelos. Si dos o más compuestos absorben a la longitud de onda de la energía radiante incidente, cada uno con diferente absortividad, no se cumplirá la ley de Beer.

La *radiación errática (luz errática)* es energía radiante que alcanza el detector a longitudes de onda distintas a las establecidas por el monocromador. Toda la energía radiante que incide sobre el detector será registrada, ya sea que haya pasado o no a través de la muestra. La Fig. 4-5 muestra los efectos de la luz errática sobre la ley de Beer. A medida que la cantidad de luz errática aumenta (o la monocromaticidad disminuye), aumenta la desviación de la ley de Beer (decrece la linealidad).

Instrumentación

Espectrofotómetro de haz simple.

La mayoría de los componentes de un espectrofotómetro de haz simple se muestra en la Fig. 4-6. El equipo necesario puede ser dividido en siete componentes básicos: (1) una fuente estable de energía radiante; (2) una hendidura de entrada para el enfoque de la luz; (3) un selector de longitud de onda; (4) una hendidura de salida para el enfoque de la luz; (5) un dispositivo para mantener el recipiente transparente (cubeta) que contiene la solución a ser medida; (6) un detector de energía radiante; y (7) un dispositivo para leer la señal eléctrica generada por el detector. Si se utiliza un filtro como selector de longitud de onda, se dispone solo de luz monocromática a longitudes de onda discretas y el instrumento es llamado *fotómetro*. Si se usa un monocromador (esto es, un prisma o una red de difracción, ver abajo) como selector de longitud de onda, el equipo puede proporcionar luz monocromática sobre un intervalo continuo de longitudes de onda y es llamado *espectrómetro* o *espectrofotómetro*. Los espectrofotómetros pueden ser instrumentos de doble haz con dos portacubetas, una para la muestra y otra para el blanco o muestra de referencia. Las ventajas de un instrumento de doble haz incluyen la capacidad de hacer correcciones simultáneas para los cambios en la intensidad de la luz, en la eficiencia de la red de difracción, en las variaciones en el ancho de la hendidura, etc., esto es particularmente útil para obtener curvas espectrales.

Fuentes de energía radiante.

Una lámpara con filamento de tungsteno es útil como fuente de un espectro continuo de energía radiante de 360 a 950 nm (Fig. 4-7). La lámpara de yoduro de tungsteno se utiliza frecuentemente como fuente de energía radiante visible y ultravioleta cercana. Los filamentos de haluros de tungsteno son de mayor duración, producen más luz a longitudes de onda corta, y emiten energía radiante de mayor intensidad que los filamentos de tungsteno.

Las lámparas de descarga de hidrógeno y deuterio emiten un espectro continuo, siendo utilizadas en la región del espectro ultravioleta (de 220 a 360 nm) (Fig. 4-8). La lámpara de deuterio tiene más intensidad que la de hidrógeno. Las lámparas de vapores de mercurio producen un espectro discontinuo o de líneas (313, 365, 405, 436 y 546 nm) (Fig. 4-8). Estas son útiles para propósitos de calibración de longitudes de onda pero no son utilizadas en muchos espectrofotómetros. La lámpara de mercurio es usada en fotómetros y en espectrofotómetros, empleándose para cromatografía líquida de alta resolución. Recientemente, están siendo empleados diodos emisores de luz como fuente luminosa.

Es importante entender que una cantidad de luz emitida de una fuente de luz no es constante en un intervalo continuo de longitudes de onda, por consiguiente una lámpara normal tiene un espectro complejo de transmitancia máxima y mínima (Fig. 4-7 y (Fig. 4-8). Las lámparas de diversos tipos pueden variar y también las de los diferentes fabricantes. Por lo tanto uno debe tener cuidado en la elección de una lámpara para un análisis determinado, ya que la cantidad de luz emitida a una longitud de onda deseada debe ser muy pequeña o muy grande. Por ejemplo, las lámparas de hidrógeno o deuterio usadas para el análisis ultravioleta, tienen una salida máxima de radiación en el rango de 250 a 300 nm. La salida de energía radiante de longitudes de onda larga (mayores de 340 nm) es considerablemente menor y puede ser muy débil para muchos análisis.

Selectores de longitud de onda.

El aislamiento de la longitud de onda o del intervalo de longitudes de onda puede



realizarse con el uso de filtros o monocromadores. Los filtros son dispositivos sencillos, que consisten en un solo material, que transmite selectivamente la longitud de onda deseada y absorbe el resto de las longitudes de onda. En un monocromador, la energía radiante de una fuente de luz se dispersa por una red *de difracción o un prisma* en un espectro, en el cual la longitud de onda deseada se aísla mediante hendiduras mecánicas.

Filtros. Hay dos tipos de filtros: (1) los que tienen características de transmisión selectivas, que incluyen los filtros de vidrio y Wratten, y (2) los que se basan en los principios de interferencia (filtros de interferencia). El filtro Wratten consiste de una capa de gelatina coloreada entre láminas de vidrio claro; los filtros de vidrio están compuestos de una o más capas de vidrio coloreado. Ambos tipos de filtros transmiten más energía radiante en algunas partes del espectro que en otras.

Los filtros de interferencia funcionan sobre un principio diferente. El fundamento es el mismo que aquel en que se basa el juego de colores de una película de jabón, y se denomina interferencia. Cuando la energía radiante choca contra una película delgada, parte se refleja en la superficie frontal, pero el resto de la energía radiante que penetra la película se refleja por la superficie del otro lado. Los últimos rayos de energía radiante han viajado más que el primero por una distancia igual al doble del espesor de la película. Si los dos rayos reflejados están en fase, la intensidad resultante se duplica, pero si no están en fase se eliminan uno al otro. Por lo tanto cuando la luz blanca choca contra la película, algunas longitudes de onda reflejadas serán aumentadas y otras destruidas, resultando en colores.

Monocromadores. Los monocromadores pueden dar un rango más estrecho de longitudes de onda que los filtros y son fácilmente ajustables sobre un amplio intervalo del espectro. El elemento dispersante puede ser un prisma o una red de difracción.

La dispersión por un prisma es no lineal, haciéndose menos lineal a longitudes de onda largas (sobre 550 nm). Por lo tanto, para validar la calibración de longitudes de onda, uno debe verificar tres longitudes de onda. Los prismas dan sólo una medida del espectro emergente y de esta manera proporcionan mayor eficiencia óptica, dado que la energía incidente es distribuida sobre un solo espectro.

Una red de difracción consiste en un gran número de líneas guías paralelas, igualmente espaciadas sobre una superficie. La dispersión por una red de difracción es lineal, por lo tanto sólo dos longitudes de onda diferentes deben verificarse para validar la exactitud de las longitudes de onda.

Ancho de banda. Con excepción de los dispositivos ópticos láser, la luz obtenida por un selector de longitud de onda no es verdaderamente monocromática (esto es, una longitud de onda individual) sino que consiste en un intervalo de longitudes de onda. El grado de monocromaticidad está definido por los siguientes términos. *Ancho de banda* es el intervalo de longitudes de onda que pasan a través de una hendidura de salida en un dispositivo selector de longitudes de onda. La *longitud de onda nominal* de este haz de luz es la longitud de onda en la cual ocurre el pico de la intensidad luminosa. Para un selector de longitud de onda como un filtro monocromador en el que la hendidura de entrada y salida son del mismo ancho, la longitud de onda nominal es la longitud de onda media del espectro emergente.

El intervalo de longitudes de onda obtenido por un filtro que produce un espectro simétrico es habitualmente conocido por su ancho de banda medio. Éste describe las

longitudes de onda obtenidas entre los dos lados del espectro a un valor de transmitancia igual a la mitad del pico de transmitancia (Fig. 4-9). Para los monocromadores, el grado de monocromaticidad se describe por el ancho de *banda nominal*, el cual corresponde a estas longitudes de onda que son centradas sobre el pico de longitudes de onda y transmiten el 75% del total de la energía radiante presente en el haz de luz emergente. Para los monocromadores con hendiduras de salida variables, el ancho de banda también variará.

Hendiduras. Existen dos tipos de hendiduras presentes en los monocromadores. La primera, a la entrada, enfoca la luz sobre la red de difracción o prisma, donde será dispersada con un mínimo de luz errática. La segunda hendidura, a la salida, determina el ancho de banda que seleccionamos del espectro de dispersión. Con el aumento del ancho de la hendidura de salida, el ancho de banda de la luz emergente se hace más amplio, produciendo un aumento en la intensidad de la energía pero disminuye la pureza espectral. En los monocromadores de red de difracción, la hendidura de salida puede ser de un ancho fijo, derivando en un ancho de banda constante. Por el contrario, los monocromadores prismáticos tienen hendiduras de salida variables.

El propósito de ambas clases de hendiduras en los fotómetros con filtro es hacer la luz paralela y reducir la luz errática.

Cubetas. El receptáculo en el cual se coloca la muestra para determinaciones espectrométricas se denomina *cubeta* o *celda*. Las cubetas de vidrio son apropiadas para usarse en el intervalo de 320 a 950 nm. Para mediciones por debajo de 320 nm es necesario el uso de celdas de cuarzo (sílica). Estas celdas pueden utilizarse también en longitudes de ondas altas. La Fig. 4-10 ilustra el patrón de transmisión de varios tipos de cubetas. Existen cubetas de sección cuadradas y circulares (tubos de ensayo). Se alcanza una gran exactitud con cubetas cuadradas con lados paralelos hechos con *vidrio óptico*. Aunque las cubetas tienen usualmente dimensiones internas de 1 cm (longitud del paso de luz), se pueden encontrar cubetas con otras dimensiones.

Detectores

Celdas con capa de barrera (fotovoltaicas o fotocélulas). Estos detectores consisten en una lámina de cobre o hierro sobre el cual se ha colocado una lámina semiconductora de óxido cuproso o selenio. Esta capa está cubierta por una lámina de metal transparente que sirve como electrodo colector. A medida que el destello pasa a través de este electrodo hacia la placa semiconductora, se induce un flujo de electrones en la placa y puede medirse en el amperímetro. Estos detectores son resistentes, relativamente económicos y sensibles desde la región ultravioleta hasta los 1000 nm. No se necesita fuente de poder externa, la fotocorriente producida es directamente proporcional a la intensidad de la energía radiante.

Las fotocélulas exhiben un efecto de fatiga el cual significa que con el destello, la corriente sube por encima del valor de equilibrio aparente y luego decrece gradualmente.

Tubos fotomultiplicadores. Es un tubo electrónico capaz de amplificar significativamente la corriente. El cátodo está fabricado de un metal sensible a la luz, que puede absorber energía radiante y liberar electrones en forma proporcional a la energía radiante que choca contra la superficie del metal sensible a la luz. Estas superficies varían en su respuesta a la luz de diferentes energías (longitudes de onda) y así también en la sensibilidad del tubo fotomultiplicador (Fig.4-11). Los electrones producidos por el primer estado de energía van a una segunda superficie, donde cada electrón produce entre cuatro a seis



electrones adicionales. Los electrones del segundo estado energético se dirigen a otro estado, donde nuevamente producen entre cuatro a seis electrones. En los tubos fotomultiplicadores actuales están presentes hasta 15 estados (o dínodos) (Fig. 4-12). Los tubos fotomultiplicadores tienen un tiempo de respuesta rápido, son muy sensibles y no muestran efectos de fatiga como otros detectores.

Fotodiodos. Son semiconductores que cuando son impactados por la luz cambian su voltaje de carga (usualmente 5 V). Los cambios de voltaje son transformados en corriente y de esa manera son cuantificados. Un fotodiodo está compuesto por una matriz bidimensional de cientos de finos semiconductores colocados muy cercanos entre sí. La luz del instrumento se dispersa por la red de difracción o prisma dentro del fotodiodo. Cualquier posición o diodo en esta configuración está calibrado para corresponder con una longitud de onda específica. Cada diodo se examina y el cambio electrónico resultante es calculado para ser proporcional a la absorción. El espectro completo es registrado en milisegundos.

Rendimiento del instrumento

La sensibilidad de respuesta de un espectrofotómetro es una combinación de la emisión de la lámpara, eficiencia del filtro o monocromador en la transmisión de la luz, y la respuesta del fotomultiplicador. Como todos estos factores son funciones de la longitud de onda, está claro que el instrumento debe ser reajustado cuando uno cambia las longitudes de onda. La mayoría de las veces, este nuevo establecimiento de condiciones consiste en el ajuste de la solución blanco para que la lectura sea 100% T (cero de absorbancia) cambiando la ganancia del fotomultiplicador.

Existen una serie de recomendaciones sobre especificaciones propuestas que abarcan muchos aspectos de los instrumentos usados para análisis fotométricos. [ref\(136\)](#) Estas especificaciones están señaladas en la Tabla 4-4.

Selección de las condiciones óptimas y limitaciones

Cuando se establece un nuevo procedimiento espectrofotométrico, es importante registrar el espectro de absorción del material que va a ser medido. Este espectro de absorción debe ser registrado con relación a ambos, agua o blanco de reactivo, según el método de análisis elegido. Algunos ejemplo de estos espectros se presentan en la sección de métodos de este texto. Este espectro ayudará para determinar la mejor longitud de onda que se utilizará en los análisis espectrofotométricos. La longitud de onda óptima para un análisis específico dependerá de varios factores, incluyendo la absorción máxima del cromógeno, la pendiente del pico de absorción, y el espectro de absorción de posibles cromógenos interferentes.

Un ejemplo del espectro de absorción se ilustra en la Fig. 4-13. De acuerdo con la ley de Beer, cuanto mayor sea el coeficiente de absorción molar, mayor será la absorción a una concentración y longitud de onda determinada, y mayor será la sensibilidad del método. En este e
spectro hay tres picos de absorción (coeficiente de absorción más alto): λ_1 , λ_2 y λ_3 nm. La absorptividad de λ_2 es muy baja y su uso puede ser descartado inmediatamente.



Si un pico de absorción es muy estrecho, como el de λ_1 , cualquier pequeño error en el ajuste del espectrofotómetro a esta longitud de onda producirá un cambio grande en la absorbancia. Con espectrofotómetros de ajuste manual de longitudes de onda, esto puede causar grandes imprecisiones y errores analíticos entre cada análisis. Con los fotómetros de filtro se requiere un filtro exacto de alta calidad, para asegurar la exactitud cuando se está trabajando con un pico de absorción estrecho.

Estos problemas pueden resolverse usando un pico de absorción más ancho (λ_3). Con este pico de absorción, pequeños cambios en los ajustes de la longitud de onda producirán cambios insignificantes en la capacidad de absorción y se obtendrá mayor precisión y exactitud.

La sensibilidad de muchos métodos puede aumentarse por el uso de bandas de absorción a longitudes de onda corta (tal como la ultravioleta), dado que estas son muy intensas frecuentemente. Sin embargo existe una absorción inespecífica a longitudes de onda corta de los amortiguadores u otras especies químicas en las soluciones. Por lo tanto, deben usarse blancos apropiados para obtener medidas exactas. En algunas técnicas el compuesto analizado es purificado antes del análisis y su detección es factible a longitudes de onda corta (ultravioleta), proporcionando una sensibilidad óptima.

El conocimiento de las longitudes de onda en las cuales los cromógenos interferentes absorben luz más comúnmente, ayuda a determinar la selección adecuada de la longitud de onda. Una regla general para seleccionar la longitud de onda óptima en la cual se va a medir una reacción espectrofotométrica incluye tres criterios: (1) Seleccionar un pico de absorción con el mayor coeficiente de absorción molar. (2) Elegir el pico relativamente más amplio. (3) Escoger el pico que esté lo más lejos posible de los picos de absorción de los cromógenos interferentes.

Pruebas para el control de calidad de los espectrofotómetros^{ref(137)}

Existen varias pruebas de control de calidad que deben realizarse para validar que los espectrofotómetros estén funcionando dentro de sus especificaciones. Estas pruebas son exactitud de longitud de onda, respuesta lineal del detector, radiación errática (luz errática) y exactitud fotométrica. Los detalles de las pruebas de rendimiento del espectrofotómetro pueden encontrarse en las referencias 5^{ref(138)} y 13^{ref(139)}.

Exactitud de la longitud de onda.

Si cambia la calibración de longitud de onda de un instrumento, la medición de la absorbancia también cambia. La magnitud del error de absorbancia atribuible a la calibración de la longitud de onda, depende de la localización relativa del punto en el espectro de absorción del cromóforo a ser medido. Es decir, el error de la absorbancia con respecto al error de la longitud de onda, es mayor cuando la medición de la absorbancia se realiza en la pendiente de la banda de absorbancia que cuando se realiza cerca del pico de la banda de absorbancia. El mantenimiento de la calibración de la longitud de onda es particularmente importante para los análisis espectrofotométricos, como las determinaciones enzimáticas.

El método más adecuado para controlar la exactitud de las longitudes de onda es el reemplazo de la lámpara por una fuente de energía radiante que emita fuertes líneas de



longitudes de onda bien definidas. Entre las fuentes de energía radiante útiles tenemos: (1) la lámpara de vapor de mercurio, la cual tiene fuertes líneas de emisión a 313, 365, 405, 436 y 546 nm, y (2) lámpara de deuterio o hidrógeno, las cuales tienen líneas de emisión entre 486 y 656 nm (Fig. 4-8). Los espectrofotómetros equipados con lámparas de deuterio o hidrógeno tienen fuentes internas fabricadas para controlar la exactitud de la longitud de onda.

Un segundo método para verificar la calibración de la longitud de onda involucra el uso de filtros de compuestos de tierras raras, como el óxido de holmio y didimio. El óxido de holmio tiene fuertes líneas de absorción a 241, 279, 287, 333, 361, 418, 453, 536 y 636 nm. El didimio tiene bandas de absorción más anchas a 573, 586, 685, 741, 803 nm. Como existe la posibilidad del deterioro de los filtros, se debe verificar periódicamente la exactitud de la longitud de onda.

Un tercer método para evaluar la calibración de la longitud de onda implica el uso de soluciones. Se puede emplear una solución de un cromógeno estable como estándar secundario en la calibración de la longitud de onda, para determinar si la exactitud de la misma en un instrumento ha variado después que ha sido validada la exactitud de la longitud de onda por un estándar primario de calibración, como la lámpara de mercurio o deuterio. Las desventajas de usar soluciones químicas para la calibración de longitudes de onda son: que los picos de absorción generalmente son anchos y los cambios espectrales pueden resultar de la contaminación, envejecimiento, o errores de preparación.

Independientemente del método, para los instrumentos con red de difracción es necesaria la calibración a dos longitudes de onda, mientras que los instrumentos con prisma deben calibrarse a tres longitudes de onda.

Linealidad en la respuesta del detector.

Un espectrofotómetro que funcione adecuadamente debe mostrar una relación lineal entre la energía radiante absorbida y la lectura final del instrumento. La linealidad del instrumento es un prerequisite para la exactitud espectrofotométrica y analítica. Los filtros de vidrio sólido pueden utilizarse para validar la linealidad del instrumento. El método más común para certificar la linealidad de la respuesta del detector, consiste en el uso de soluciones de concentraciones variables con un componente conocido que sigue la ley de Beer. Algunos compuestos utilizados para este propósito son la oxihemoglobina a 415 nm, p-nitrofenol a 405 nm, sulfato de amonio y cobalto a 512 nm, sulfato cúprico a 650 nm y colorante verde vegetal a 257, 410 y 630 nm.

Las absorbancias de soluciones que contienen concentraciones crecientes de algunos de estos compuestos son graficados contra una concentración conocida. Las gráficas no lineales de absorbancia frente a concentración indican un error en la dilución o un problema de instrumentación. Además, un detector defectuoso, la radiación errática o una hendidura muy abierta puede ocasionar también una respuesta no lineal.

Luz errática.

Se observa frecuentemente un aumento de la luz errática en los extremos terminales del intervalo espectral, donde la respuesta del detector o fuente de energía es muy baja. La luz errática produce usualmente una desviación negativa de la ley de Beer, los métodos para detectarla emplean filtros o soluciones que tienen una alta transmisión sobre una porción del



espectro, pero son opacos por debajo de la longitud de onda límite. Se han usado varias soluciones para verificar la luz errática, incluyendo Li_2CO_3 debajo de los 250 nm, NaBr (0.1 mol/l) por debajo de los 240 nm y acetona debajo de los 320 nm. La longitud de onda exacta en la cual ocurre el límite es una función de la concentración, longitud del paso de luz de la celda y temperatura; por lo que las longitudes de onda reportadas pueden variar ligeramente. Muchos filtros pueden detectar luz errática. Si se emplean filtros o soluciones que no transmiten energía radiante a la longitud de onda de la medición, la transmitancia medida será la cantidad de luz errática presente. La multiplicación de esta transmitancia por 100 nos dará el porcentaje de radiación errática. Es indicativo que un instrumento funciona mal cuando la cantidad de luz errática excede el 1%.

Las acciones a tomar para eliminar la radiación errática comprenden el cambio de la fuente de luz, verificación de la calibración de las longitudes de onda, sellar las rendijas de luz, realinear los componentes del instrumento y limpiar las superficies ópticas.

Exactitud fotométrica.

Cuando se realizan análisis que no utilizan estándares químicos, la exactitud de la absorbancia es crucial. Un calibrador de absorbancia debe tener una absorbancia contante y estable a una longitud de onda adecuada, es decir, que no presenta sensibilidad al ancho de banda espectral de un instrumento y a las variaciones en la configuración del haz de luz. Estos estándares deben ser fáciles de usar y disponibles. El Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (“National Institute of Standards and Technology” o “NIST”, en inglés) provee un grupo de tres filtros de vidrio con densidad neutra (SBM 930), que tiene absorbancias conocidas en cuatro longitudes de onda para cada filtro. Estos filtros no son completamente estables y deben recalibrarse periódicamente por el NIST.

Las soluciones de dicromato de potasio, sulfato de cobalto y amonio, y nitrato de potasio se están usando como estándares para validar la exactitud fotométrica. Las soluciones estándares están sujetas a cambios de absorbancia por la temperatura, tiempo y pH, que los hacen poco convenientes como estándares de calibración a largo plazo.

Espectrofotometría de reflectancia

En la espectrofotometría de “reflectancia”, un haz de luz es dirigido a una superficie plana y la luz reflejada se cuantifica. La luz reflejada de la superficie se enfoca en un tubo fotomultiplicador. El equipo puede ser similar a un espectrómetro de filtro de haz simple (Fig. 4-14). La lámpara genera una luz que pasa a través del filtro y de una serie de hendiduras, y luego es enfocada sobre la superficie de prueba. Parte de la luz que incide en la muestra se absorbe por los cromóforos de la superficie y la luz remanente es reflejada. (Esto es análogo al paso de luz a través de una solución, pero además en este caso, parte de la luz es absorbida y el resto pasa a lo largo). Luego la luz reflejada pasa a través de una serie de hendiduras, lentes y al fotodetector. La señal luego se convierte en una lectura apropiada. El término *densidad de reflexión* es utilizado para describir la absorción de la luz por los cromóforos en la superficie. La densidad de reflexión está relacionada con la intensidad de luz reflejada por una muestra.^{ref(140)} La densidad de reflexión, D_R , de una muestra está dada por la razón de la



luz reflejada por un material reflector estándar (usualmente una superficie N revestida de sulfato de bario), R_O , entre la luz reflejada por la muestra, R_{test} , como se muestra en la ecuación

$$D_R = \log (R_O/R_{test})$$

Esta ecuación es semejante a la ecuación que relaciona %T (y por lo tanto, absorbancia) con la luz incidente transmitida (ver ecuación, pág. 87). En general, las propiedades ópticas de las diferentes superficies varían considerablemente. Las propiedades ópticas del papel para reactivo o cintas de plástico difieren de las de una película seca. Por lo tanto, para calibrar un instrumento a fin de medir la densidad de reflexión, se debe usar un estándar con la superficie específica empleada en el sistema de prueba. El valor D_R en la ecuación de arriba puede corregirse por la reflectancia errática. Debe utilizarse un estándar negro con las mismas características superficiales de la muestra de prueba para obtener el valor máximo de absorbancia. Cada lectura de reflexión del instrumento bajo de estas condiciones será la reflectancia errática. Este valor se puede restar del valor de la prueba para corregir esta variable. El uso de la reflectancia permite medidas cuantitativas de reacciones sobre superficies tales como tiras reactivas o películas secas (reacciones de química seca).

Las desventajas de este método son los problemas de estandarización. La cantidad de luz reflejada y su respectiva medición, están sujetas al tipo de instrumento. Las variables son: el ángulo en el cual se mide la reflexión, el área de superficie, etc. También, las variaciones de la superficie de prueba (ocasionados durante los procesos manuales o de fabricación) pueden alterar las propiedades de la superficie reflectante.

Registrando la espectrofotometría espectral

El registro del espectro completo de absorción se utiliza ya sea para la identificación de los compuestos o para convertir matemáticamente el espectro en su primera o segunda derivada. El registro del espectro puede realizarse con los espectrofotómetros descritos arriba o por sistemas detectores de arreglos de diodo, donde hay una relación espacial entre las líneas espectrales esparcidas por un prisma o red de difracción y el detector de luz del diodo. La primera y segunda derivadas espectroscópicas son la conversión matemática de la curva de absorción en la función derivada. Estas derivadas sirven para eliminar las interferencias de las líneas de absorción espectrales observadas y permite análisis más exactos.

Absorción Atómica^{refs(141)}

La espectrofotometría de absorción atómica se usa en el laboratorio clínico para la determinación de calcio, magnesio, litio, plomo, zinc, y otros metales.

Fundamento

Los átomos vaporizados en estado basal absorben luz en intervalos de longitud de onda definidos muy estrechos. Estas bandas de absorción están en el orden de 0.001 a 0.01 nm de ancho, y por consiguiente el espectro completo de átomos se denomina espectro de *línea*.



Si estos átomos en el estado de vapor son excitados, ellos regresan al estado basal emitiendo una luz de la misma longitud de onda discreta que el espectro de línea. En la espectrofotometría de absorción atómica la forma iónica de los elementos no se excita en la llama pero sí se disocia de sus uniones químicas, y mediante la atracción de electrones libres producidos por el proceso de combustión, regresa al estado atómico basal. En esta forma es capaz de absorber luz a la longitud de onda específica de su espectro de línea.

En la absorción atómica un haz de energía radiante que contiene el espectro de línea del elemento por medirse, pasa a través de la llama que contiene el metal vaporizado a determinarse. La fuente de energía radiante se denomina *lámpara de cátodo hueco*. La longitud de onda de la energía radiante absorbida es la misma que sería emitida si el elemento fuera excitado. Con la ayuda de un monocromador, se mide la atenuación de una de las longitudes de onda de la luz incidente. Lo que ocasiona esta atenuación, es la interacción de los fotones con los átomos en el estado basal en la llama. La ley de Beer es válida para relacionar la concentración de los átomos en la llama y la transmisión o absorción de luz. Solo un pequeño porcentaje de átomos en la llama están excitados y la mayoría de los átomos se encuentran en una forma capaz de absorber la energía radiante emitida por la lámpara de cátodo hueco.

Instrumentación

En la Fig. 4-15 se muestra la mayoría de los componentes de un espectrofotómetro de absorción atómica.

Lámpara de cátodo hueco.

La lámpara de cátodo hueco es la forma más práctica para generar un espectro de línea de la pureza espectral requerida. Las lámparas tienen un cátodo hueco o en forma de copa, que está recubierta con el metal puro del elemento a determinarse o con una aleación apropiada. Se utiliza una lámpara diferente para cada elemento, excepto por algunas ocasiones en que el cátodo puede estar fabricado de tal manera que una sola lámpara sirve para dos o tres elementos (tal como el calcio y el magnesio). La lámpara se llena con un gas inerte monoatómico, usualmente argón o neón a baja presión. El gas inerte seleccionado para la lámpara puede variar con el compuesto que se va a medir. Por ejemplo, el plomo y el hierro se pueden analizar con lámparas de neón, mientras que los análisis de litio se realizan mejor con lámparas de argón. Para medir otros elementos, la elección del gas inerte no es tan crítica. Se pueden utilizar como ventana el cuarzo o un vidrio especial que permitan la transmisión a una longitud de onda apropiada. Se suministra una corriente a un cátodo y los iones del metal son liberados continuamente (expulsados) de la superficie interna del cátodo, llenando la lámpara con un vapor atómico. Los átomos en este vapor experimentan una excitación electrónica por colisiones con el gas inerte y los átomos excitados resultantes emiten su energía radiante característica cuando regresa el electrón a su estado basal. Esto genera un haz de energía radiante con la longitud de onda correspondiente para la absorción por los átomos en estado basal en la llama.

Quemador.

En la espectrofotometría de absorción atómica, la muestra deberá pasar al estado gaseoso.



Esta técnica convierte la muestra en un fino aerosol mientras se introduce en la llama. Este proceso se denomina *nebulización*. El nebulizador se considera generalmente parte del quemador. En el interior de la llama, el solvente se evapora del aerosol liberando partículas microscópicas que se desintegran bajo la influencia del calor para producir átomos. Este fenómeno se denomina *atomización*. El acetileno es el combustible más usado en el quemador. En la absorción atómica se alcanzan usualmente temperaturas de 2300° C.

Dos tipos de quemadores se usan en muchas aplicaciones clínicas. Uno es el quemador de consumo total. Con este quemador, los gases y la muestra se mezclan dentro de la llama. La llama en estos tipos de quemadores puede producir mucho calor, ocasionando disociaciones moleculares, las cuales pueden ser deseables para algunos sistemas químicos. El segundo tipo es el quemador de premezcla (quemador de flujo laminar), en el cual las gotitas grandes de la atomización van al desecho y no hacia el interior de la llama. La longitud del paso óptico a través del quemador de premezcla es mayor que la del quemador de consumo total, proporcionando una mayor sensibilidad. La temperatura de la llama no es tan alta como en el quemador de consumo total.

Absorción atómica sin llama.

El propósito de la llama es transformar la muestra en vapor atómico. La llama puede reemplazarse por otros procesos de atomización. Un proceso aplicable al análisis de mercurio usa reacciones químicas para transformar el mercurio en vapor atómico. Se descompone la muestra por la digestión con ácidos, luego un agente reductor se agrega para transformar el mercurio al estado elemental, finalmente un flujo de gas impulsa el vapor de mercurio a través del aparato a una celda sellada con ventanas de cuarzo en el paso del haz óptico. La absorbancia se mide a 253.7 nm.

En otra técnica de atomización frecuentemente empleada, la muestra se deseca en un tubo o plataforma de carbón. La mezcla se vaporiza en una atmósfera inerte cuando una corriente eléctrica pasa a través del soporte para crear instantáneamente una temperatura suficientemente elevada para vaporizar el compuesto analizado. Estos atomizadores están en el espacio ocupado normalmente por la llama en los instrumentos de absorción atómica de llama (AA). Las temperaturas alcanzadas por la absorción atómica sin llama (sobre los 2700° C) son necesarias para vaporizar metales pesados. Los instrumentos de absorción atómica sin llama tienen una mayor sensibilidad que los instrumentos de absorción atómica de llama.

Monocromadores y detectores.

Los monocromadores (redes de difracción o prismas) y los tubos fotomultiplicadores pueden aislar señales de energía radiante pura y medir la intensidad de esa señal, respectivamente. El monocromador no permite que la energía radiante extraña, ya sea de otras longitudes de onda del espectro de línea o de la luz generada por la llama, alcance el tubo fotomultiplicador. El tubo fotomultiplicador transforma la energía radiante que no fue absorbida en la llama en una señal y la amplifica conduciéndola a un medidor o contador.

Fuentes de error

En las mediciones de absorción atómica se pueden presentar interferencias químicas, de ionización, por la matriz y del quemador. Otros factores como la temperatura,



composición del solvente, contenido de sales, viscosidad y la tensión superficial pueden ser la causa de variaciones de muestra a muestra o entre muestras desconocidas y estándares.

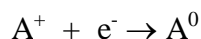
Interferencia química.

La presencia de ciertos aniones de algunos elementos en la muestra ocasiona la formación de compuestos que no son completamente disociados en la llama. El resultado es la disminución en el número de átomos en estado basal presentes en la llama. El ejemplo más común de interferencia química es la formación de uniones estrechas de los complejos de calcio con los aniones, especialmente los iones fosfato. El efecto de estos aniones se minimiza o elimina agregando lantano a la muestra para desplazar el calcio del complejo. El lantano forma un complejo más estable con el fosfato que con el calcio.

En la absorción atómica sin llama, la interferencia química puede provenir de los compuestos que se vaporizan junto con el elemento a medirse. La adición de “modificadores de la matriz” a la muestra permite que la vaporización del elemento se produzca a altas temperaturas, permitiendo que los compuestos interferentes sean quemados a temperaturas más bajas.

Interferencia por ionización.

Cuando los átomos en la llama son ionizados (A^+) en lugar de permanecer en el estado basal (A^0), ellos no absorberán la luz incidente. Esto se denomina *interferencia por ionización*, y este efecto produce una disminución aparente de la concentración del compuesto analizado. Se puede corregir la interferencia al agregar un exceso de una sustancia que es más fácilmente ionizable, aportando de esta manera electrones libres. El exceso de electrones libres, por lo tanto desplaza la reacción:



para la formación de átomos en estado basal. La interferencia por ionización se minimiza por el manejo de la llama a las temperaturas bajas de la combustión de aire-acetileno.

Interferencia de la matriz.

Las diferencias en las matrices entre la muestra y los estándares pueden ocasionar errores. A veces se agregan proteínas en los estándares cuando el factor de dilución sérico es pequeño. Los efectos de la matriz se minimizan cuando las diferencias en la composición entre la muestra y el estándar no son significativas. Los estándares de calcio deben contener concentraciones fisiológicas de sodio, ya que el sodio ocasionará una interferencia negativa.

La técnica de “adición de estándares” a sido empleada para minimizar las diferencias de la matriz en las mediciones del aluminio u otros elementos por absorción atómica sin llama. En esta técnica, diferentes concentraciones del estándar son agregados a las muestras diluidas, y todo será medido por AA sin llama. El intercepto negativo de la línea de regresión de la señal contra la cantidad de aluminio agregado es igual a la cantidad de aluminio en la muestra.

Problemas del quemador.

El componente más crítico en la espectrofotometría de absorción atómica es la llama y su nebulizador. Es esencial una llama estable y un fluido controlado de gas tanto para el



combustible como para el oxidante. Es importante que la cabeza del quemador esté limpia para un análisis exacto y preciso. Igualmente, en la absorción atómica sin llama, la plataforma de carbón debe cambiarse después de un número de descargas para proporcionar resultados reproducibles.

Interferencia de emisión.

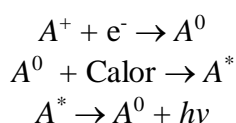
Muchos átomos de compuestos analizados cuando se introducen en la llama son excitados y emiten un fotón al regresar al estado basal. La luz emitida es, por supuesto, de la misma longitud de onda que la luz incidente que se está midiendo. La luz emitida aumenta la señal que recibe el fotodetector, y dicha señal es traducida en forma de una absorción disminuida, y por lo tanto detecta una concentración erróneamente baja del compuesto analizado. Esta interferencia puede ser eliminada usando un "rebanador" o "*chopper*", en inglés (ver Fig. 4-15), para crear un haz de luz incidente en forma de pulsos proveniente de la lámpara de cátodo hueco. Sin embargo, la luz ocasionada por la interferencia de emisión es un haz de luz producido constantemente. Esta emisión estable puede ser diferenciada electrónicamente del haz en forma de pulso de luz transmitida y de esta manera ser eliminada como una fuente de interferencia.

Fotometría de Llama^{refs(142)}

La fotometría de llama fue ampliamente utilizada en el laboratorio clínico para determinar las concentraciones de sodio, potasio y litio en los líquidos biológicos. Hoy en día esta técnica es poco utilizada.

Fundamento

Los átomos de algunos metales, cuando reciben suficiente energía térmica suministrada por una llama, serán excitados y reemitirán esta energía a longitudes de onda particulares para el elemento previamente descrito. Las reacciones experimentadas por los iones en la llama son las siguientes



A^* representa el átomo excitado en la llama, A^0 es un átomo con la energía electrónica en estado basal, y $h\nu$ es un fotón. Los metales alcalinos son relativamente fáciles de excitar en la llama. El litio produce una emisión roja en la llama; el sodio, una amarilla; y el potasio, un color rojo-violeta. Estos colores son característicos de los átomos de los metales que están presentes como cationes en solución.

La intensidad de la longitud de onda característica de la energía radiante producida por los átomos en la llama es directamente proporcional al número de átomos excitados, los cuales son directamente proporcionales a la concentración de la sustancia de interés en la muestra. El número efectivo de átomos presentes en un estado excitado es una pequeña fracción del total



de átomos presentes en la llama.

Una revisión de la técnica de fotometría de llama se encuentra en la referencia. [ref\(143\)](#)

Fluorometría^{refs(144)}

Fundamento

La fluorescencia puede considerarse uno de los productos de las interacciones de la luz con la materia. Cuando la luz choca con la materia, puede simplemente pasar a través de ella como en una solución transparente, puede ser dispersada por la interacción, o puede ser absorbida. Cuando la luz es transmitida, no hay pérdida de energía; cuando es dispersada, no hay cambio de energía; la luz tiene la misma longitud de onda antes y después de interactuar con la materia. Pero cuando la luz es absorbida, hay una conversión de la luz de la energía luminosa en diversas formas, incluyendo transiciones sin radiación (conversión de energía en calor) y otras, como fluorescencia y fosforescencia donde se emiten fotones (Fig. 4-16). La absorción de la luz puede utilizarse, por supuesto, para determinar la concentración de los componentes como se hace en espectroscopía de absorción. Si la luz absorbida es reemitida, los fotones liberados pueden usarse para cuantificar el compuesto emisor (flúor). La cuantificación también es posible con el uso de la luz dispersada, ya que la cantidad de luz dispersada está relacionada con el número y tamaño de las partículas en solución. Los métodos que usan luz dispersada son llamados *nefelometría* y *turbidimetría* (ver pág. 100).

La luz fluorescente es el resultado de la absorción de un fotón de energía radiante por una molécula. Cuando esta molécula absorbe el fotón, aumenta su nivel de energía. Ya que la energía molecular es mayor que la de su entorno, tratará de liberar el exceso de energía por medio de la expulsión de otro fotón, dando como resultado la emisión de fluorescencia o fosforescencia.

Para que ocurra la fluorescencia, debe existir una buena probabilidad de que la energía del estado excitado pueda ser convertida al estado basal por la expulsión de un fotón. En general no todos los componentes fluorescen; de hecho muy pocos tienen esta propiedad. Entre los que fluorescen, ningún fotón absorbido será transformado en luz fluorescente. Algunos componentes excitados perderán energía mediante transiciones sin radiación, debido a la transferencia de la energía al solvente. Para una misma cantidad de luz absorbida, las moléculas con una mayor eficiencia de fluorescencia, serán más brillantes o con una fluorescencia mayor. En las soluciones, cuando una molécula regresa a su estado basal por la emisión de un fotón, hay una menor energía en el fotón emitido que la que estaba absorbida inicialmente. En otras palabras, la luz fluorescente emitida es de una longitud de onda mayor que la radiación excitada o absorbida (Fig. 4-17).

Instrumentación

Los componentes básicos de un fluorómetro son similares a los de un espectrofotómetro de absorción. La diferencia mayor es la introducción de un grupo de filtros o monocromadores antes y después de la celda para aislar la luz emitida. En la Fig. 4-18 se presenta un diagrama del fluorómetro.

Los principales componentes son: luz de excitación, filtros o monocromadores para



separar la luz excitada de la emitida, y un detector sensible. Lo más frecuente es que la medición de la luz fluorescente se realice en un ángulo de 90 grados con respecto a la luz de excitación. Esto se realiza para maximizar la sensibilidad del instrumento, minimizando la cantidad de luz de excitación que pueda alcanzar el fotodetector. El detector es un fotodetector o un dispositivo similar que puede cuantificar la mínima señal de luz fluorescente y de esta manera alcanzar el nivel deseado de sensibilidad. Porque el espectro de absorción varía de un componente a otro, el instrumento debe estar optimizado para cualquier compuesto que se va a determinar. Esto se hace mediante el ajuste de la longitud de onda de excitación para lograr el máximo de absorción de los fotones, lo cual usualmente significa colocar el instrumento en las condiciones en que se obtiene la absorción máxima del compuesto. Además debe determinarse la longitud de onda de emisión máxima de los fotones fluorescentes, siendo esta la longitud de onda en la cual la señal fluorescente es comúnmente registrada.

Limitaciones

La señal fluorescente de un compuesto se ve afectada por muchas variables que incluyen: 1) solvente, 2) pH, 3) temperatura, 4) absorbancia de la solución, y 5) presencia de sustancias interferentes o específicamente aquellas que atrapan la luz. La estandarización no se hace usualmente por un procedimiento único como en la espectroscopía de absorción, ya que la fluorescencia varía dependiendo de: 1) la intensidad de la luz incidente sobre la muestra, 2) la cantidad de luz interceptada por el detector que es regulada por las hendiduras, 3) el ancho de banda de la luz analizada 4) la eficiencia del detector. El rendimiento cuántico o eficiencia de emisión de luz de un fotón es constante si el solvente, pH, temperatura, y otros parámetros se mantienen constantes. Pero en general el instrumento no se mantendrá constante diariamente. Por lo tanto, para la mayoría de las mediciones se emplea el rendimiento de fluorescencia relativa. Para un blanco de reactivos en un ensayo fluorométrico, solo pueden ajustarse el cero o la fluorescencia nula. No hay equivalencia a la escala de transmisión del 100%. Por lo tanto la señal electrónica variará de un instrumento a otro para la misma concentración del compuesto analizado.

Para hacer una curva lineal con respecto a la concentración con una serie de estándares fluorescentes, la absorbancia de las soluciones no debe exceder de 0.1. Por arriba de esta concentración, todas las partes de la solución no son iluminadas uniformemente; es decir la capa de la solución inicialmente iluminada absorberá más luz que la capa final, de esta manera la capa inicial fluorecerá más que final. Con soluciones diluidas, como las que tienen absorbancias menores de 0.1, esto no ocurre. Sin embargo, ciertos análisis emplean la relación cuantitativa inversa entre la intensidad de la fluorescencia y la cantidad de luz absorbida por una solución cuya absorbancia es mayor que 0.1. Tales pruebas son denominadas *análisis de atenuación de la fluorescencia*. En estos sistemas se coloca una cantidad constante de colorante fluorescente para cada solución control y de prueba. En la muestra, el compuesto analizado causa una reacción en la cual se produce un compuesto que absorbe luz. A mayor cantidad del producto de reacción colorido formado por el compuesto analizado, menor será la cantidad de luz absorbida por el colorante fluorescente. Por consiguiente la disminución del paso de luz a través de la solución resulta en una reducción proporcional en intensidad de fluorescencia, la cual está relacionada con la concentración del compuesto analizado en la



muestra.

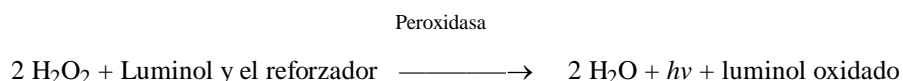
Fluorescencia de resolución tardía^{ref(145)}

Una aproximación que puede usarse para mejorar la sensibilidad de las técnicas de fluorescencia es la *fluorescencia de resolución tardía*. El tiempo de emisión de la fluorescencia en muchas moléculas fluorescentes, como la fluoresceína, está en el rango de los nanosegundos (nseg); es decir la señal de la fluorescencia decrece en un intervalo de 100 nseg. Algunos compuestos como el quelato metálico dicetona-europio tienen una vida media de fluorescencia muy larga; de 10 a 1000 microsegundos (μseg). Cuando se mide la fluorescencia después de 400 μseg, durante un período adicional de otros 400 μseg, se puede obtener la intensidad de fluorescencia de estos compuestos sin interferencia de la luz dispersada o por cualquier otra molécula que emita fluorescencia. Aparte del aumento en la especificidad del análisis, esta técnica proporciona un incremento considerable en la sensibilidad.

Los instrumentos especializados que usan esta técnica iluminan la muestra por un período de tiempo, luego detienen la iluminación, y después miden la fluorescencia emitida en un tiempo especificado de 400 a 800 μseg después de la iluminación (Fig. 4-19). Una limitación de esta técnica es la necesidad de pasos de separación debido a que los compuestos quelados no pueden medirse directamente en los líquidos biológicos (para más detalles ver el capítulo 13).

Quimioluminiscencia^{refs(146)}

La quimioluminiscencia es cualquier reacción química en la cual uno de los productos es la luz. La enzima peroxidasa puede reaccionar con moléculas como el luminol (5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazindiona) para producir luz como uno de los productos de la reacción. La reacción del luminol produce emisión de fotones en el intervalo de 400 a 450 nm. La baja producción de fotones en esta reacción limita su sensibilidad y su aplicación. En todo caso, con la adición de moléculas reforzadoras (luciferín, 6- hidroxibenzotiazol) la reacción continuará por más tiempo (30 min o más) aumentando varios miles de veces la producción de fotones. Los productos de estas reacciones no son conocidos. Una reacción parcial puede ser escrita como sigue:

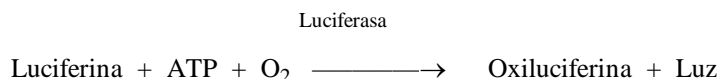


La peroxidasa frecuentemente es parte de la técnica de inmunoensayo enzimático, en el cual es la enzima marcada. Esta reacción se puede medir con una serie de diferentes tubos fotomultiplicadores sensibles. La ventaja de esta técnica es que es muy sensible. Una molécula de peroxidasa puede convertir varios millones de moléculas de sustrato por minuto. De esta manera la detección puede ser más sensible que la realizada con radioisótopos. La desventaja de esta técnica es que la reacción se realiza en un sistema heterogéneo en el cual la peroxidasa se fija a una fase sólida. El H₂O₂ y el luminol deben estar en un sistema libre de matrices biológicas, como suero, y por lo tanto es necesario un paso de separación.



Otro sistema de coloración que produce una reacción quimioluminiscente cuantitativa utiliza los ésteres de acridina y los dioxetanos. Los ésteres de acridina son frecuentemente oxidados por el peróxido de hidrógeno para producir luz, mientras los dioxetanos están hechos de derivados ésteres de fosfato estable, que al hidrolizarse se degradan espontáneamente, produciendo luz como uno de sus productos.

La bioluminiscencia es un fenómeno que ocurre de manera natural, se ha estudiado extensivamente e involucra una reacción muy conocida de las moléculas luciferina, adenosín trifosfato (ATP) y luciferasa en presencia de oxígeno.



La reacción es cuantitativa por que se libera un fotón de luz por cada molécula de ATP consumido. La sensibilidad de la reacción se ve limitada sólo por la capacidad del fotodetector de contar fotones.

Fluorescencia de polarización^{refs(147)}

La luz se considera compuesta por un vector electrónico y uno magnético. Si la luz se polariza, todos los vectores electrónicos tendrán la misma orientación.

Cuando una molécula fluorescente absorbe luz, excita a un cromóforo que tiene una orientación específica, produciendo la transición de un electrón a un nivel de energía superior. La molécula excitada emite luz a medida que el electrón (oscilador fluorescente) regresa al nivel de energía inferior. Las mediciones de la fluorescencia polarizada requieren un colorante con una orientación electrónica, donde la luz emitida retiene la misma orientación inicial de la luz incidente. Como ejemplo de este tipo de moléculas tenemos: la fluoresceína. Si se utiliza luz polarizada para excitar las moléculas de fluoresceína, la fluorescencia reemitida también estará polarizada. Sin embargo, las moléculas giran en solución, perdiendo además su orientación y la polarización de fluorescencia. En la polarización de fluorescencia, el colorante debe seleccionarse de modo que su rotación molecular sea tan alta entre los tiempos de absorción y emisión de luz, que la molécula viene a ser orientada aleatoriamente durante este período y la fluorescencia se polariza de forma mínima. La cantidad que se mide es la intensidad de la luz orientada o la diferencia entre la luz orientada y la no orientada.

Para medir la luz polarizada están disponibles varias opciones. Un enfoque es, excitar la solución de prueba con luz polarizada en una dimensión y registrar la cantidad de fluorescencia emitida. Se coloca el polarizador inmediatamente después del primer monocromador, como se muestra en el diagrama de un fluorómetro en la Fig. 4-18. Luego, la solución es excitada por luz que está polarizada a 90 grados con relación a la luz utilizada en la primera excitación, y la fluorescencia emitida se registra. La polarización (P) se determina a través de la siguiente ecuación:

$$P = \frac{I_{VV} - I_{HV}}{I_{VV} + I_{HV}}$$



donde I_{vv} es igual a la señal registrada cuando se utiliza luz polarizada verticalmente para excitar la muestra, mientras que I_{hv} es la respuesta producida cuando la luz polarizada horizontalmente se usa para excitar la muestra. La luz emitida se determina del polarizador vertical con una orientación de 90 grados de la luz incidente, usando un segundo polarizador colocado antes del segundo monocromador.

Numerosos procesos afectan la polarización final. Para muchos colorantes fluorescentes, incluyendo el más conocido, la fluoresceína, la orientación de la luz se retiene si la molécula se mantiene rígida. Cuando una molécula gira aleatoriamente por el proceso de movimiento browniano, la polarización se pierde. La capacidad de una molécula en solución para girar parcialmente depende de la viscosidad de la solución y el volumen molecular. Cuando la viscosidad de una solución o el volumen molecular aumenta, las moléculas fluorescentes giran lentamente y la polarización aumenta. En el caso de los inmunoensayos de fluorescencia polarizada, cuando el derivado de fluoresceína-medicamento se une por el anticuerpo, el volumen molecular aumenta y por ende la fluorescencia polarizada aumenta. Cuando el derivado no se une, tanto el volumen molecular como la fluorescencia polarizada son bajos (ver capítulo 13).

Las medidas de la fluorescencia polarizada pueden realizarse con mucha exactitud y se afectan muy poco por las variaciones en la intensidad de la fluorescencia, a diferencia de la fluorescencia estándar (ver ecuación previa). De este modo, se alcanza fácilmente una precisión de la medición en el orden del 1% o más, que se traduce en un análisis más exacto. Otra ventaja de la fluorescencia polarizada es que la técnica se puede usar como un análisis homogéneo. Entre las desventajas están, el hecho de que la técnica está limitada al uso de colorantes fluorescentes, se requiere frecuentemente de una instrumentación muy especializada para medir sólo la intensidad o polarización de la fluorescencia, y además el sistema es menos flexible que la espectroscopía de absorción. En general, es determinante controlar la temperatura y la viscosidad cuando uno desarrolla fluorescencia polarizada.

Nefelometría y Turbidimetría [refs\(148\)](#)

Fundamentos

Interacción de la luz con las partículas.

Para comprender el fundamento de los análisis de nefelometría y turbidimetría se debe primero examinar el concepto de la dispersión de la luz. Cuando un haz de luz colimado (es decir paralelo, no divergente) choca con partículas en suspensión, parte de este rayo es reflejado, algo es dispersado, algo es absorbido, y algo es transmitido. La nefelometría es la medición de la luz dispersada por partículas en solución. La turbidimetría mide la luz dispersada como una disminución de la luz transmitida a través de la solución.

Para comprender la nefelometría debe examinarse la pregunta de cómo la luz es dispersada por una suspensión de partículas *homogéneas*. Pueden ocurrir tres tipos de dispersión. Si la longitud de onda, λ , es mucho mayor que el tamaño de la partícula ($d < 0.1 \lambda$), la luz se dispersará simétricamente alrededor de la partícula, ocurriendo un mínimo en la intensidad de la dispersión a 90 grados respecto al rayo incidente, como lo descrito por Rayleigh (Fig. 4-20, A).

Si la longitud de onda de la luz incidente es mucho menor que el tamaño de la partícula ($d > 10 \lambda$), la mayor parte de la luz aparecerá dispersada hacia adelante por causa de una retrodispersión destructiva fuera de fase; como se describe en la teoría de Mie (Fig. 4-20, B).

Si en cambio, la longitud de la luz es aproximadamente igual al tamaño de las partículas, aparece más luz dispersada hacia adelante que hacia atrás (Fig. 4-20, C), según lo describe Rayleigh-Debye.^{ref(149)}

Una de las aplicaciones más comunes de los análisis de dispersión de la luz, es la medición de las reacciones antígeno-anticuerpo. Ya que la mayoría de los complejos antígeno-anticuerpo son sistemas heterogéneos con partículas de un diámetro de 250 a 1500 nm y las longitudes de onda usadas en la mayoría de los analizadores de dispersión son de 320 a 650 nm, la dispersión es esencialmente Rayleigh-Debye, con un blanco de dispersión descrito en la dispersión de Rayleigh. De esta manera, la capacidad de detectar la dispersión de la luz hacia delante ($\theta = 15$ a 90 grados) proporcionará una mayor sensibilidad a las determinaciones nefelométricas. Como en el caso de los nefelómetros de velocidad y láser.

Detección de la luz dispersa

Turbidimetría. La turbidimetría es la medida de la reducción en la transmisión de la luz ocasionada por la formación de partículas, y cuantifica la luz residual transmitida (Fig. 4-21). La instrumentación requerida para las determinaciones turbidimétricas va desde un simple espectrofotómetro manual, disponible en la mayoría de los laboratorios, hasta sofisticados analizadores discretos. Ya que esta técnica mide la disminución de una amplia señal de luz transmitida, la sensibilidad de la turbidimetría está limitada principalmente por la exactitud fotométrica y la sensibilidad del instrumento. Los equipos usados para turbidimetría pueden ser utilizados para otras pruebas, como los ensayos enzimáticos y aquellos ensayos basados en métodos colorimétricos.

Nefelometría. La nefelometría, detecta la porción de la luz que es dispersada en una variedad de ángulos (Fig. 4-22). La sensibilidad de este método depende principalmente de la ausencia de un blanco o fondo de dispersión debido a que el instrumento detecta un pequeño aumento de la señal a un ángulo de dispersión, θ , sobre un fondo negro o nulo. Idealmente la luz no se detecta en ausencia de muestras dispersantes, por lo que la dispersión subsecuente en la muestra se mide contra un fondo negro. La señal se amplifica por un fotomultiplicador y de esta manera se aumenta el intervalo de detección. Sin embargo, estas determinaciones requieren la utilización de un nefelómetro, el cual tiene una aplicación limitada para otras pruebas.

Instrumentación

Diagrama esquemático del instrumento.

Un diagrama esquemático de los componentes básicos de un nefelómetro está representado en la Fig. 4-23. Un sistema típico consiste en una fuente de luz, un sistema de colimación, un selector de longitud de onda como un filtro (estos dos últimos no son necesarios con fuentes de luz láser); una cubeta para la muestra, una trampa para la luz errática, y un fotodetector.

Fuente de luz.



Los fluoronefelómetros utilizan una lámpara de arco de mercurio de presión media como fuente de luz, la cual sirve para nefelometría y fluorometría. La intensidad relativamente alta de luz y la emisión de bandas de longitud de onda corta hacen de ésta una buena fuente. Otras fuentes de luz van desde simples lámparas de filamento de tungsteno de bajo voltaje y diodos de emisión de luz hasta sofisticados dispositivos láser de bajo poder. Los equipos láser producen rayos intensos de luz estable y altamente colimados (típicamente 1 miliradian de divergencia) que no requieren colimadores ópticos adicionales como las otras fuentes de luz. En los sistemas ópticos que usan luz láser es más fácil reducir la luz errática que contribuye a la dispersión de fondo y enmascara el haz transmitido, permitiendo de esta manera la medición de la dispersión hacia adelante. Este aumento en la intensidad de la luz realizado con el láser también permite mejorar la relación señal-ruido, pero está algo limitada por la saturación del detector. Entre las desventajas de las fuentes láser tenemos: el costo, problemas de seguridad, y el hecho de su disponibilidad restringida o limitada a longitudes de onda fijas. Dado que el tamaño de las partículas puede cambiar continuamente durante la reacción analítica, como la formación de inmunoprecipitados, la luz dispersa de longitud de onda simple puede cambiar mientras que el promedio de luz dispersa sobre muchas longitudes de onda permanece relativamente constante. El sistema “array” de la compañía “Beekman” emplea un filtro de banda ancha para la selección de regiones de longitud de onda de una lámpara de tungsteno normal para superar este problema, el cual es evidentemente más agudo en los métodos que miden la velocidad de formación cuando el tamaño de la partícula cambia rápidamente.

En todos los casos, el sistema fotodetector debe cotejarse a la longitud o longitudes de onda de luz dispersa, el cual por nefelometría y turbidimetría, corresponde a la longitud o longitudes de onda de la luz incidente.

Angulo de detección.[ref\(150\)](#)

Debido a que partículas del tamaño de los complejos antígeno-anticuerpo parece que dispersan más luz en dirección frontal, hay un incremento en la relación señal-ruido cuando el detector está situado más cerca del paso de luz transmitido (0 grados).

La señal blanco, mejor descrita como dispersión de Rayleigh (Fig. 4-20, A), no se afecta por un ángulo alterado de detección. Aunque en la mayoría de los primeros nefelómetros detectaban la dispersión de luz a 90 grados por razones de fácil fabricación, lo cual limitaba la capacidad de medir ángulos pequeños, la detección de la luz dispersada hacia delante deberá proporcionar teóricamente mayor sensibilidad. Los instrumentos más recientes tienden a operar con ángulos de detección más pequeños, en la mayoría de los casos optimizados para dar una mayor relación señal-ruido para las ópticas particulares de los instrumentos. Obviamente, la detección a 0 grados no es posible debido a la alta intensidad del haz transmitido, pero algunos analizadores rápidos equipados con láser que usan una máscara para bloquear el rayo transmitido pueden operar con ángulos muy pequeños. Los instrumentos que emplean detectores de ángulo-pequeño tienden a tener mayor sensibilidad que el tipo instrumentos de 90 grados.

Limitaciones: turbidimetría frente a la nefelometría

Aunque el fundamento de la nefelometría -detección de una pequeña señal



(amplificable) sobre un fondo negro- debe proporcionar a este método una mayor sensibilidad, las especificaciones y lo sofisticado de los instrumentos disponibles no alcanzan este objetivo. La turbidimetría -detección de una pequeña disminución en una señal grande- debe estar limitada en sensibilidad; sin embargo, los instrumentos actuales tienen una discriminación excelente y pueden cuantificar pequeños cambios en la señal, permitiendo de este modo determinaciones turbidimétricas que alcanzan una alta sensibilidad.

La turbidimetría y nefelometría poseen similitudes con la espectrofotometría de absorción, y muchas fuentes de interferencias y errores son comunes en estos sistemas. Varias de las técnicas analizadas en el capítulo 23, que pueden ser utilizadas para minimizar interferencias en la absorción son aplicables también en la turbidimetría y nefelometría. Sin embargo la turbidez de la muestra puede ser una interferencia en ambas técnicas. Debido a la particularidad de las determinaciones nefelométricas, especialmente en el caso de las reacciones antígeno-anticuerpo, algunas aplicaciones específicas serán discutidas más adelante en este capítulo.

Color endógeno y selección de la longitud de onda.

La teoría básica de la dispersión de la luz predice que la intensidad de la luz dispersada aumenta a medida que se utilizan longitudes de onda menores de luz incidente. La mayoría de los ensayos inmunológicos que emplean proteínas séricas requieren la selección de una longitud de onda, en la cual ninguna de las proteínas o los componentes cromogénicos del suero absorben significativamente. Dado que las proteínas absorben fuertemente por debajo de los 300 nm y el suero tiene un pico de absorción de 400 a 425 nm debido a las porfirinas, los instrumentos tienden a funcionar en los intervalos de 320 a 380 ó de 500 a 650 nm. La reducción de la concentración de proteínas mediante diluciones puede disminuir la absorción de fondo. La mayoría de las reacciones inmunoquímicas determinadas por nefelometría utilizan anticuerpos de alta afinidad para permitir grandes diluciones de las proteínas con el consecuente mejoramiento de la sensibilidad.

Comparación de la sensibilidad.

La sensibilidad en los nefelómetros está controlada en gran parte por la cantidad de dispersión de fondo de las muestras y reactivos. Dado que la dispersión de fondo puede ser alta con relación a la dispersión específica, los instrumentos no alcanzan su mayor potencial de sensibilidad. Esta limitación, unida a las altas longitudes de onda generadas en los instrumentos láser, explica el hecho de que los instrumentos láser no presentan un mayor incremento en la sensibilidad sobre los nefelómetros convencionales.

La sensibilidad en las determinaciones turbidimétricas depende de la capacidad del detector para resolver pequeños cambios en la intensidad de la luz. Usando bajas longitudes de onda y espectrofotómetros de alta calidad con sistemas de detección de alta precisión, generalmente la sensibilidad de la turbidimetría es adecuada para muchas determinaciones y en muchos de los casos es comparable con la nefelometría. Teóricamente, con los perfeccionamientos adicionales, la nefelometría debe proveer finalmente una mayor sensibilidad que la turbidimetría.

Análisis de punto final contra análisis cinético.

El examen de la luz dispersada como una función del tiempo, después de la mezcla antígeno-anticuerpo, muestra que luego del retardo inicial, existe un aumento casi lineal en la dispersión seguido por el lento establecimiento de una dispersión constante. La reacción



secundaria se produce más lentamente que la primera debido a que se forman partículas más grandes que comienzan a flocular, distorsionando la intensidad de dispersión observada a ángulos frontales. Las determinaciones de turbidimetría y nefelometría se comportan de esta manera.

Existen dos maneras básicas para la medir de la luz dispersa causada por esta reacción; análisis cinético y de punto final. El análisis de punto final requiere la determinación de un blanco (reactivo) y debe transcurrir una cantidad de tiempo razonable antes de la medición final. La Fig. 4-24 muestra la dispersión de luz hacia adelante (directa) desarrollada a un ángulo de 70 grados en un analizador nefelométrico de velocidad.^{ref(151)} Comparando las dos gráficas se pueden observar las diferencias entre el análisis de punto final (valor del blanco contra la lectura a $t = x$) y un análisis de velocidad o cinético (aumento en la intensidad de la dispersión sobre un intervalo de tiempo). El enfoque cinético, que resta electrónicamente cualquier señal del blanco, no requiere que se corra un blanco de reactivo separado en el ensayo. Ambos análisis cinético y de punto final se utilizan igualmente en nefelometría y turbidimetría.

Refractometría

Fundamento

Cuando un haz de luz incide sobre una superficie puede ser reflejado, absorbido, o si el material es transparente, puede atravesar el límite y emerger del otro lado. Cuando la luz pasa de un medio a otro, la trayectoria del haz de luz cambiará de dirección en la superficie de la interfase si su velocidad en el segundo medio es diferente de la del primero (Fig. 4-25). Esta desviación del rayo de luz se denomina *refracción*.^{ref(152)}

Dado que el grado de difracción del rayo de luz depende de la diferencia de velocidad de la luz entre dos medios diferentes, la *relación* de las dos velocidades ha sido expresada como *índice de refracción*, o *índice refractivo*. La capacidad relativa de una sustancia para desviar la luz se denomina refractividad. La expresión del índice de refracción, n , es siempre relativa al aire con la convención que n del aire = 1. La medida del índice de refracción es la medida de los ángulos, dado que la luz se desvía en un ángulo proporcional a la relación de n en el medio a través del cual pasa la luz:

$$\frac{n}{n_1} = \frac{\sin \theta}{\sin \theta_1}$$

La refractividad de un líquido depende de 1) la longitud de onda de la luz incidente, 2) temperatura, 3) la naturaleza del solvente, y 4) la masa total de soluto disuelto en el solvente. Si los primeros tres factores permanecen constantes, el índice de refracción de una solución, es una medida directa de la masa total de los sólidos disueltos.

Aplicaciones

La refractometría ha sido aplicada en la determinación de la concentración de proteínas totales del suero.³² Este análisis se basa en la suposición de que la matriz del suero (es decir,



la concentración de electrolitos y pequeñas moléculas orgánicas) permanece esencialmente constante de paciente a paciente. Debido a que la masa de proteínas es normalmente mayor que la masa de otros constituyentes del suero, pequeñas variaciones en las demás sustancias no tienen un efecto significativo en el índice de refracción del suero. Los refractómetros son calibrados contra un suero "normal" y la concentración total de proteínas es leída directamente en una escala.

La refractometría también se utiliza para estimar la gravedad específica en muestras de orina. El índice de refracción está relacionado linealmente con la masa total de solutos disueltos y por ende con la gravedad específica. Esto es útil para el intervalo encontrado normalmente en la orina (es decir, hasta 1.035 g/ml).

Interferencia

Cuando la concentración de compuestos de bajo peso molecular o materia particulada aumenta considerablemente, aparecen interferencias positivas. Esta interferencia se produce en presencia de hiperglicemia, hiperbilirrubinemia, azotemia (aumento de la urea sérica), muestras liofilizadas, e hiperlipidemia. La hemólisis produce valores falsos positivos para proteínas totales.

Instrumentación

Muchos refractómetros clínicos están basados en el refractómetro de Abbé (Fig. 4-26), fabricado por American Optical Corporation. Este refractómetro consiste en dos prismas y una serie de lentes. La luz pasa a través del primer prisma donde el rayo de luz es dispersado. La luz dispersada pasa en y a través de una fina capa de la muestra donde se refracta. El rayo de luz pasa a través de un segundo prisma, donde es dispersado nuevamente y cuando sale de nuevo es refractado. La interfase en el borde del haz de luz refractado está alineada perpendicularmente con la escala de lectura de la concentración de proteínas séricas o puede leerse la gravedad específica. La escala para la lectura de las proteínas del suero (gr/dL o gr/L) se establece mediante la calibración del instrumento contra una solución de suero "normal".

Este tipo de refractómetro es extraordinariamente simple ya que no tiene partes móviles o eléctricas. Por lo tanto, la determinación de proteínas es fácilmente reproducible con una precisión de $\pm 1\%$ y una exactitud de ± 1 g/l. El tamaño de la muestra es alrededor de 50 μ l.

Refractómetros más complejos se utilizan para monitorear la elución de análisis de cromatografía líquida de alta resolución (ver capítulo 6).

Referencias

1. Richards WG, Scott RR: *Structure and spectra of molecules*, New York, 1985, Wiley & Sons.
2. Clayton RK: *Light and living matter: the physical part*, New York, 1970, McGraw-Hill.
3. Jaffe HH, Orchin M: *Theory and applications of ultraviolet spectroscopy*, New York, 1966, Wiley & Sons.
4. Willard HH, Merritt LL, Dean JA: *Instrumental methods of analysis*, ed 4, Princeton, N.J., 1965, Van Nostrand.
5. Frings CS, Broussard LA: Calibration and monitoring of spectrometers and spectrophotometers, *Clin*



- Chem* 25:1013-1017, 1979.
6. Brewer JM, Pesce AJ, Ashworth RB, editors: *Experimental techniques in biochemistry*, Englewood Cliffs, N.J., 1974, Prentice-Hall.
 7. Keller H: Optical methods of measurement. In Richterich R, Colombo JP, editors: *Clinical chemistry*, New York, 1981, Wiley & Sons.
 8. Ward KM, Harris E: Spectrophotometry. In Ward KM, Lehmann CA, Leiken AM, editors: *Clinical laboratory instrumentation and automation: principles, application, and selection*, Philadelphia, 1994, Saunders.
 9. Narayanan S: *Principles and applications of laboratory instrumentation*, Chicago, 1989, ASCP Press, pp 8-17.
 10. Khazanie P: Spectrophotometry. In Anderson SC, Cockagne S, editors: *Clinical chemistry: concepts and applications*, Philadelphia, 1993, Saunders.
 11. *Federal Register* 57(4):7164-7165, 1992.
 12. Instrumentation Guidelines Study Group, Subcommittee on Enzymes: *Clin Chem* 23:2160-2162, 1977.
 13. Alexander LR, Barnhart ER: *Photometric quality assurance instrument check procedures*, Atlanta, Ga., 1980, U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control, Bureau of Laboratories.
 14. Curme HG, Columbus RL, Dappen GM, et al: Multilayer film elements for clinical analysis: general concepts, *Clin Chem* 24:1335-1342, 1978.
 15. Rubeska I: *Atomic absorption spectroscopy*, Cleveland, 1969, Chemical Rubber Co. Press.
 16. Robinson JW: *Atomic absorption spectroscopy*, ed 2, New York, 1973, Marcel Dekker.
 17. Winefordner JD, editor: *Spectrochemical methods of analysis*, New York, 1977, John Wiley & Sons, Inc, Wiley Interscience.
 18. Dvorak J, Rubeska I, Rezak Z: *Flame photometry: laboratory practice*, Cleveland, 1971, Chemical Rubber Co. Press.
 19. Simonson MG: The application of a photon-counting fluorometer for the immunofluorescent measurement of therapeutic drugs. In Kaplan LA, Pesce AJ, editors: *Nonisotopic alternatives to radioimmunoassay*, New York, 1981, Marcel Dekker.
 20. Pesce AJ, Rosen CG, Pasby TL, editors: *Fluorescence spectroscopy*, New York, 1971, Marcel Dekker.
 21. Wehry FL, editor: *Modern fluorescence spectroscopy*, New York, 1976, Plenum Press.
 22. Hemmiléda I: Fluoroimmunoassays and immunofluorometric assays, *Clin Chem* 31:359-370, 1985.
 23. *Enhanced luminescence: a practical immunoassay system*, Medicine Publishing Foundation Symposium Series 18, Oxford, 1986, Medicine Publishing Foundation, pp 1-56.
 24. Scholmerich J et al, editors: *Bioluminescence and chemiluminescence: new perspectives*, Chichester, 1987, Wiley & Sons.
 25. Spencer RD: Fluorescence polarization. In Kaplan LA, Pesce AJ, editors: *Nonisotopic alternatives to radioimmunoassay*, New York, 1981, Marcel Dekker.
 26. Jolly MD, Stroupe SD, Wang CJ, et al: Fluorescence polarization immunoassay. I. Monitoring aminoglycoside antibiotics in serum and plasma, *Clin Chem* 27:1190-1197, 1981.
 27. Ritchie RF, editor: *Automated immunoanalysis, parts 1 and 2*, New York, 1978, Marcel Dekker.
 28. Deverill I, Reeves WG: Light scattering and absorption developments in immunology, *J Immunol Methods* 38:191-204, 1980.
 29. Gaudie J: Principles and clinical applications of nephelometry. In Kaplan LA, Pesce AJ, editors: *Nonisotopic alternatives to radioimmunoassay*, New York, 1981, Marcel Dekker.
 30. Kusnetz J, Mansberg HP: In Ritchie RF: *Automated immunoanalysis, part 1*, New York, 1978, Marcel Dekker.
 31. Glover FA, Gauden JDS: Relationship between refractive index and concentration of solutions, *Nature* 200:1165-1166, 1963.
 32. Rubini MD, Wolf AV: Refractometric determination of total solids and water of serum and urine, *J Biol*



Chem 225:868-876, 1957.

Tablas

Tabla 4-1. Espectro electromagnético.

Microondas (IR)	Rayos gama	Rayos X	Ultravioleta (UV)	Visible	Infrarrojo
Longitud de onda 400×10^3 (nm)*	0.1	1	180	390	780
*Este es el intervalo de longitud de onda donde se produce el tipo más bajo de energía radiante respectivo.					

Tabla 4-2. Colores y colores complementarios del espectro visible.

complementario o de Longitud de onda* (nm) solución transmitido	Color Color absorbido†
350-430 amarillo	violeta
430-475 naranja	azul
475-495 rojo-naranja	azul verdoso
495-505 naranja-rojo	azul verdoso
505-555 rojo	verde
555-575 violeta-rojo	amarillo verdoso
575-600 violeta	amarillo
600-650 azul	naranja
670-700 verde	rojo
De Brown TL, Lemay HE: <i>Chemistry: the central science</i> , Englewood	



Cliffs, N.J., 1977, Prentice-Hall.

*Debido a la naturaleza subjetiva, los intervalos de longitudes de onda son solo aproximaciones.

† Si una solución absorbe luz del color de la lista en la segunda columna, el color que se observa de la solución, es decir, la luz complementaria transmitida, está dado en la tercera columna.

Tabla 4-3. Bandas de absorción electrónica para cromóforos representativos.

Cromóforo	Sistema	λ_{\max}	ϵ_{\max}	λ_{\max}
ϵ_{\max}	λ_{\max}	ϵ_{\max}		
Éter	—O—	185	1000	
Tioéter	—S—	194	4600	215
Amina	—NH ₂	195	2800	1600
Tiol	—SH	195	1400	
Disulfuro	—S—S—	194	5500	255
Sulfona	—SO ₂ —	180	—	400
Etileno	—C=C—	190	8000	
Cetona	>C=O	195	1000	270-285
Ésteres	—COOR	205	50	18-30
Aldehído	—CHO	210	fuerte	280-300
Carboxilo	—COOH	200-210	50-70	11-18
Nitro	—NO ₂	210	fuerte	
Azo	—N=N—	285-400	3-25	
Nitrato	—ONO ₂	270	12	
		(hombro)		
	—(C=C) ₂ —	210-230	21.000	
	(acíclico)			
	—(C=C) ₃ —	260	35.000	
	—(C=C) ₅ —	330	118.000	
	C=C—C≡C	219	6500	
Benzeno		184	46.700	202
255	170			6900
Antraceno		252	199.000	375
Quinolina		227	37.000	270
314	2750			3600
Isoquinolina		218	80.000	266
317	3500			4000

De: Willard HH, Merritt LL, Dean JA: *Instrumental methods of analysis*, ed 4, Princeton, N.J., 1965, Van Nostrand.

Tabla 4-4. Lineamientos para instrumentos de análisis fotométrico enzimático.



error		Intervalo o
Parámetro		(95%
confiabilidad, ± 2 SD)		
Arrastre		
De muestra muestra a muestra		<0.3%
Exactitud de la temperatura		$\pm 0.1^{\circ}\text{C}$
Tiempo de equilibrio		20 seg
Manejo de la muestra		
Exactitud		1%
Precisión		10.5%
Tamaño		50 μl o
menos		
Manejo de los reactivos		
Tiempo de mezcla		≤ 10
seg		
Rendimiento fotométrico (a una velocidad de 0.1 A/min)		
Absorbancia inicial 0-1 A		<3%
Absorbancia inicial 1-2 A		<5%
Exactitud de la longitud de onda		± 2 nm
Ancho de banda		<8 nm
Intervalo de longitud de onda		
Variable		
Intervalo de absorbancia		0-2 A
Linealidad		<2%
Paso de la celda/colocación		
<0.6%		
Desplazamiento de la absorbancia (10 a 60 min)		<2%
Exactitud de la absorbancia		<2%
Reproductibilidad de la absorbancia		
Baja 0-1 A		$\pm 2\%$
Alta 1-2 A		$\pm 4\%$
De: Instrumentation Guidelines Study Group, Subcommittee on Enzymes: Clin Chem 23:2160-2162, 1977.		

Figuras

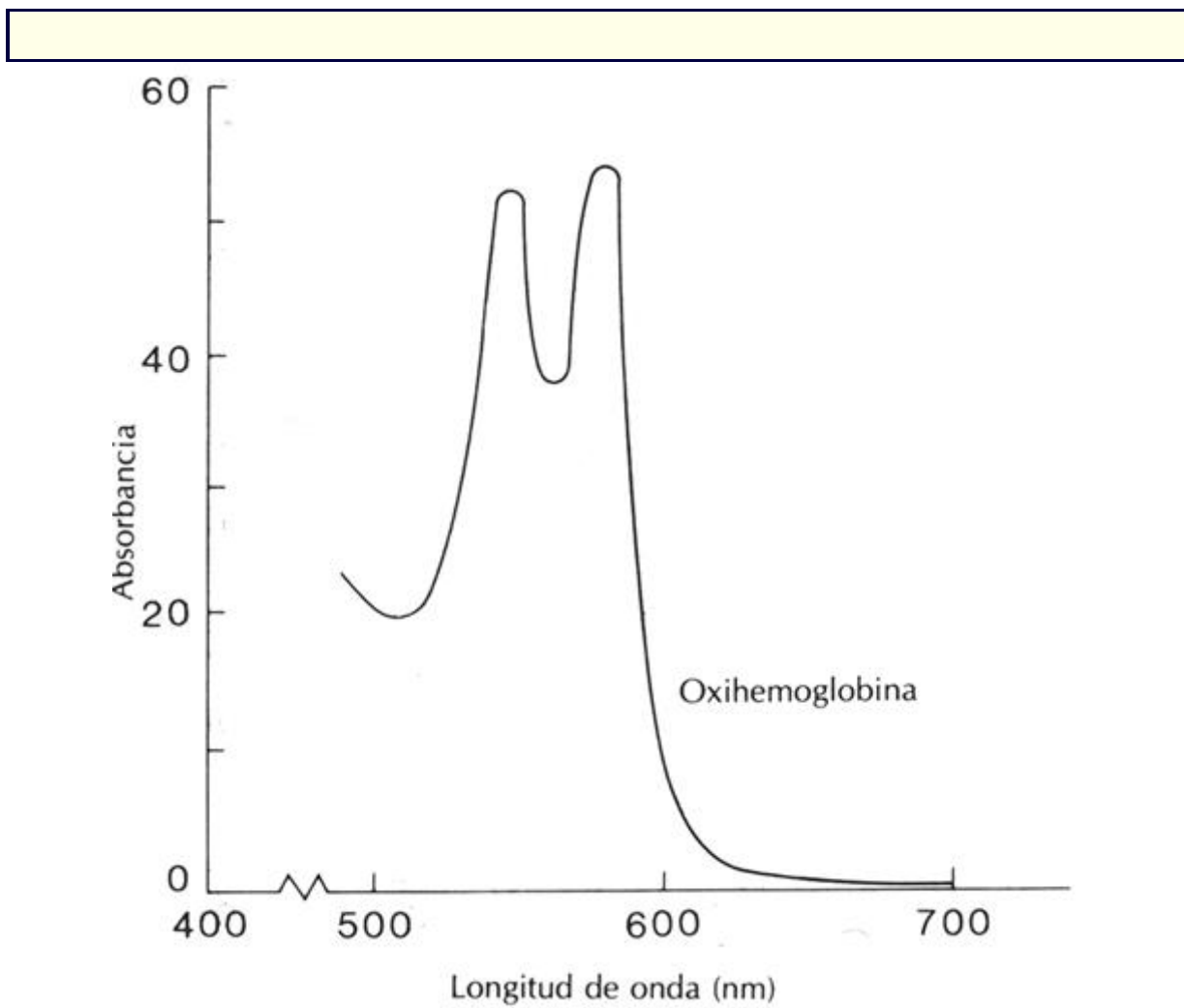


Figura 4-1 Espectro de absorción de la oxihemoglobina.

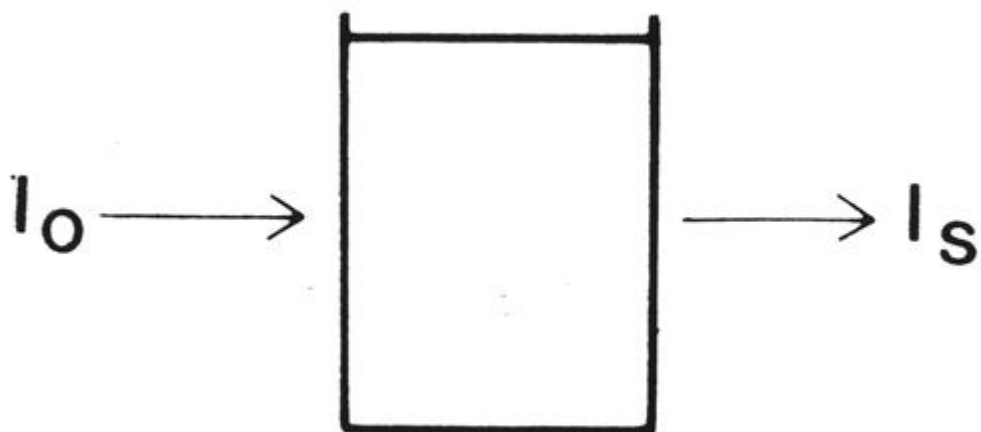


Figura 4-2 Transmitancia de la energía radiante a través de una cubeta. I_0 es la radiación incidente; I_s es la radiación transmitida.

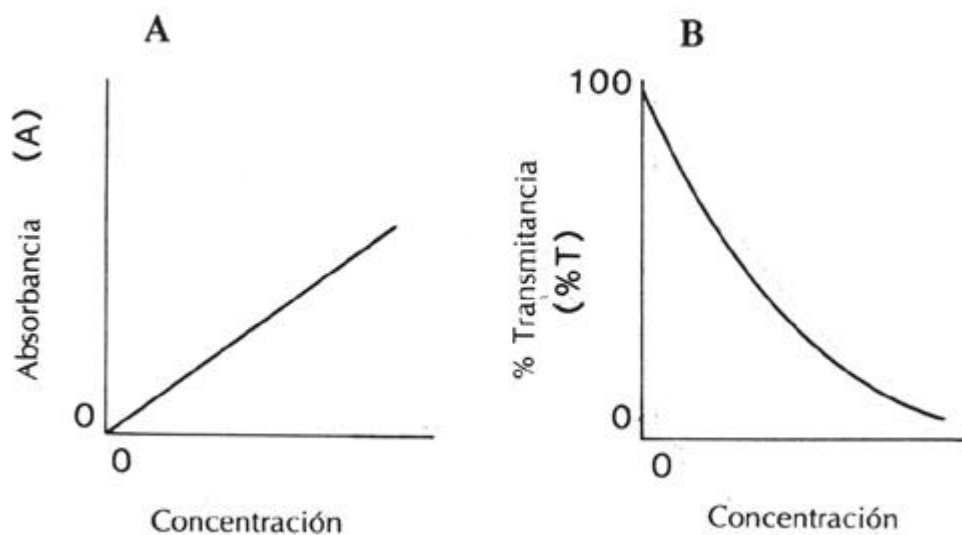


Figura 4-3 Escala que muestra la relación entre absorbancia y el porcentaje de transmitancia.

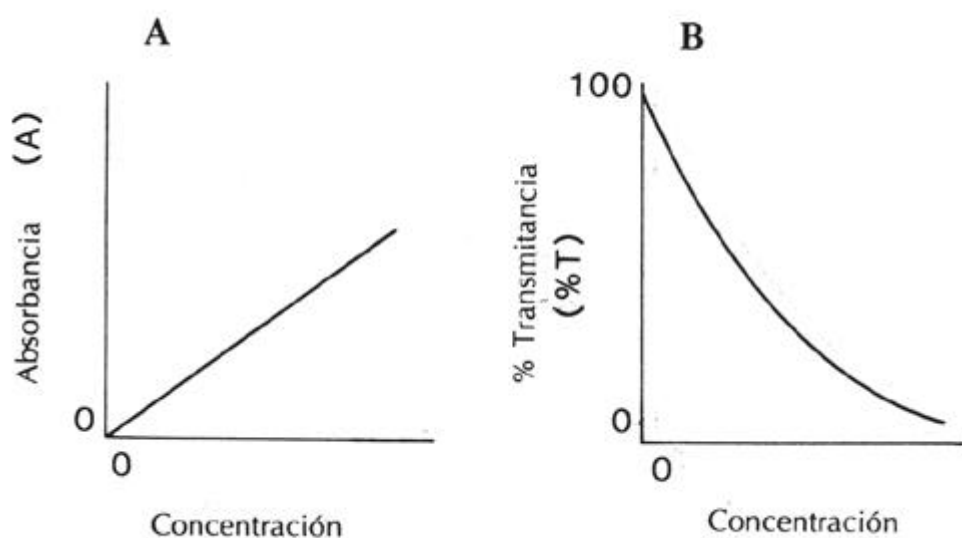


Figura 4-4 Relación de la absorbancia, A , y el porcentaje de transmitancia, B , con la

concentración.

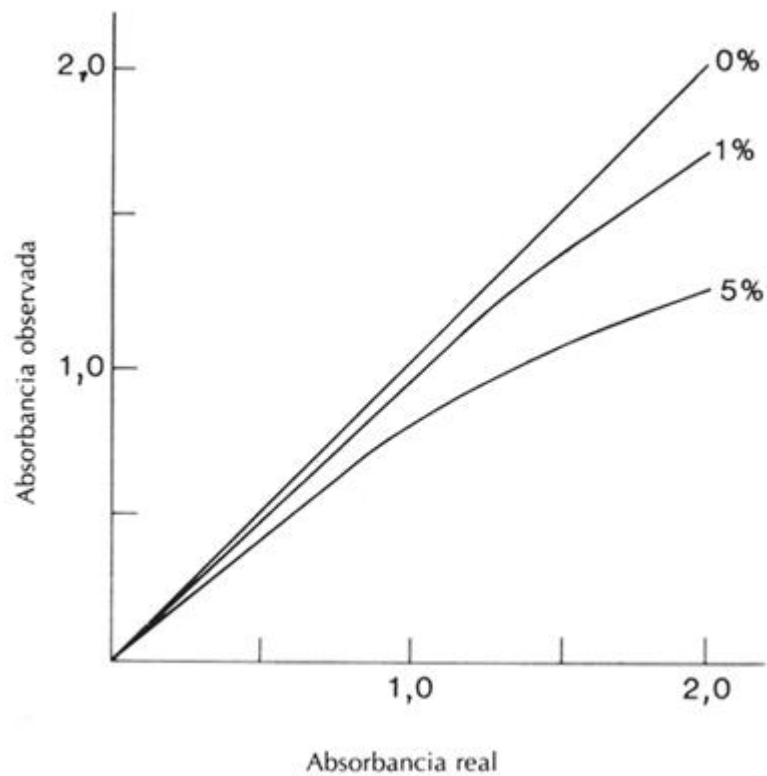


Figura 4-5 Efecto de la radiación errática sobre la absorbancia real. (De: Frings CS, Broussard LA: Clin Chem 25:1013-1017, 1979.)



Figura 4-6 Componentes de un espectrómetro. *A*, Fuente de energía radiante; *B*, hendidura de entrada; *C*, selector de longitud de onda; *D*, hendidura de salida; *E*, cubeta y portacubeta; *F*, detector; *G*, dispositivo de lectura.

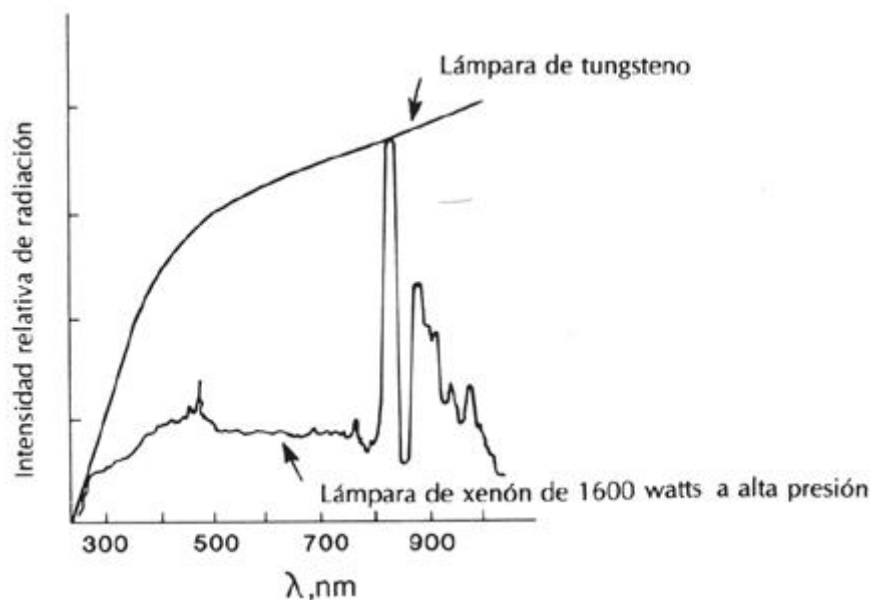


Figura 4-7 Intensidad de la energía radiante frente a la longitud de onda de un filamento de tungsteno y una lámpara de xenón de 1600 vatios. La intensidad de la lámpara de tungsteno ha sido amplificada aproximadamente unas cien veces para colocarla en la misma escala que la lámpara de xenón. (Modificado de: Brewer JM et al, editors: *Experimental techniques in biochemistry*, Englewood Cliffs, N.J., 1974, Prentice-Hall.)

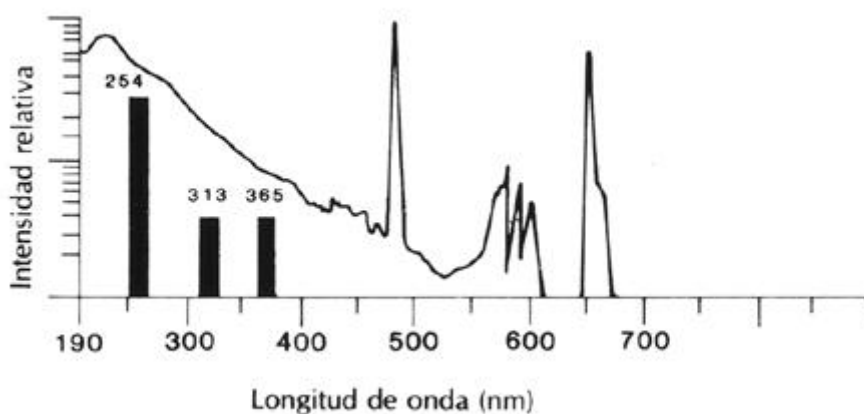


Figura 4-8 Intensidad de la energía radiante frente a la longitud de onda para una lámpara de mercurio (barras) y una lámpara de deuterio (línea continua). Para fines ilustrativos, la intensidad de las líneas de emisión de la lámpara de mercurio ha sido reducida varios cientos de veces y sólo se ilustran las líneas (la longitud de onda son los números sobre las barras) en la región ultravioleta del espectro.

I

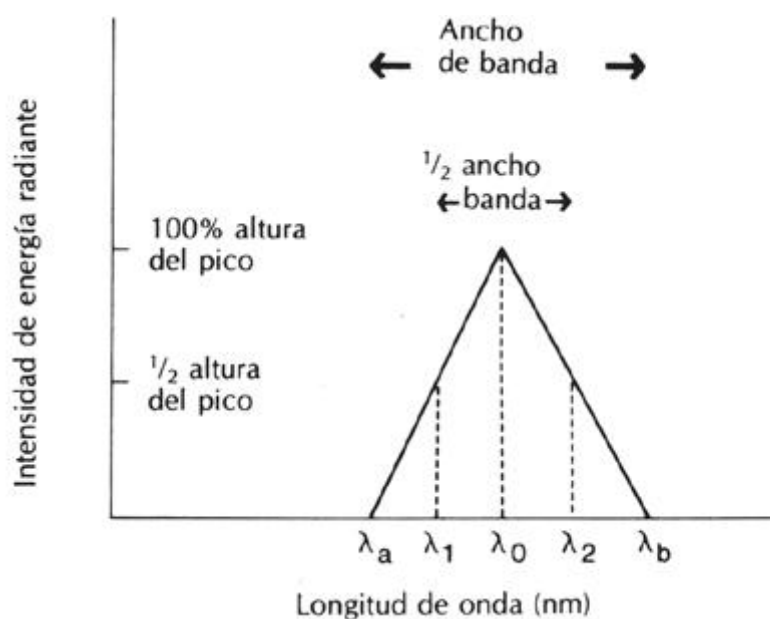


Figura 4-9 Esquema idealizado de la distribución de energía radiante emergente de la hendidura de salida de un selector de longitud de onda. Para un filtro, o un monocromador con ranuras de entrada y salida de igual de ancho, hay distribución simétrica de la energía transmitida como se muestra.

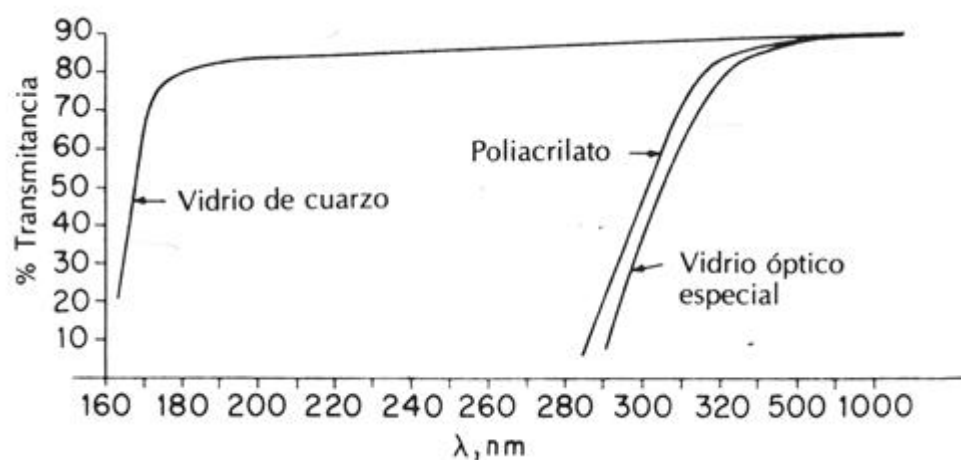


Figura 4-10 Características de transmisión de diversos tipos de materiales ópticos utilizados en la fabricación de cubetas. (De: Keller H: In Richterich R, Colombo JP, editors: *Clinical chemistry*, New York, 1981, Wiley & Sons.)

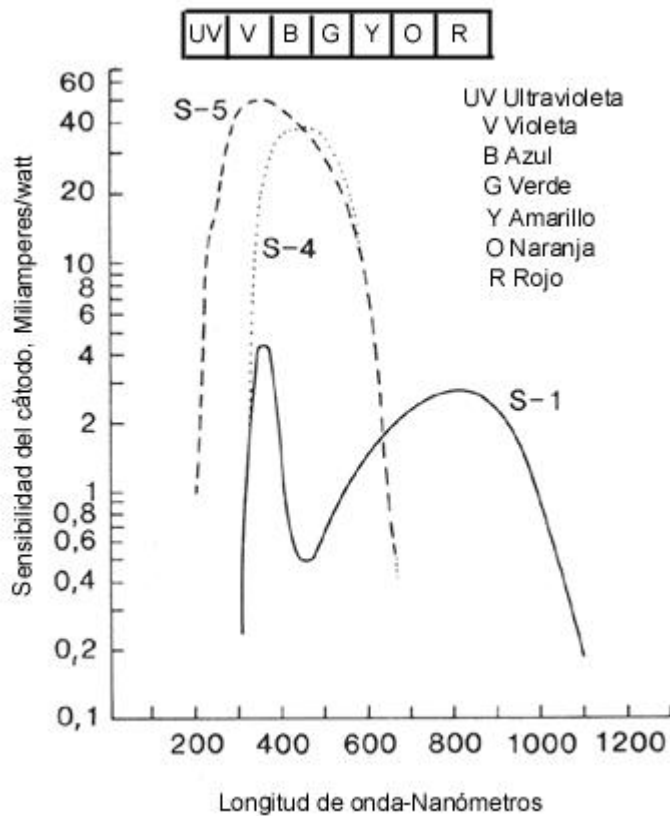


Figura 4-11 Respuesta de cátodos de varios tubos fotomultiplicadores a la energía de diferentes longitudes de onda. La sensibilidad está expresada en miliamperios de corriente generada por vatios de radiación incidente.

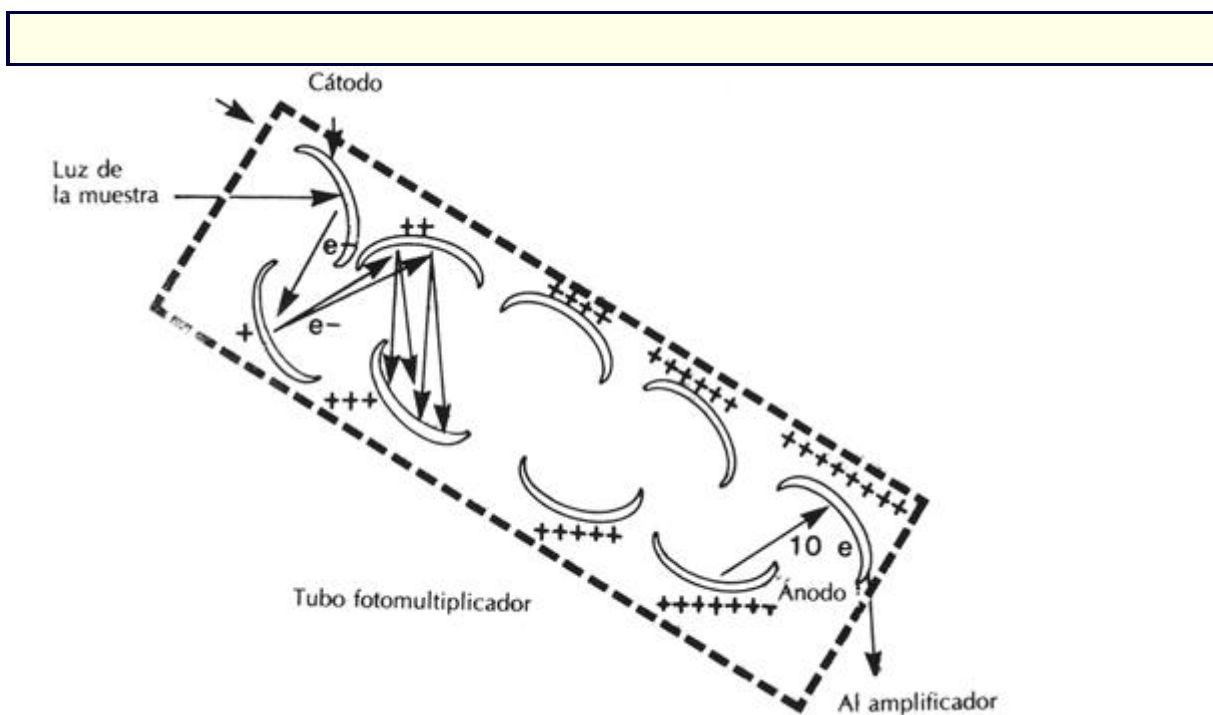


Figura 4-12 Esquema de un tubo fotomultiplicador. Cada dínodo (electrodo utilizado para generar emisiones secundarias de electrones) está representado por una media luna. La luz incide sobre el cátodo y libera un electrón. El electrón es impulsado en dirección al primer dínodo (nivel) por el voltaje aplicado. Los electrones secundarios son liberados y pasan a través de los sucesivos díodos, los cuales se encuentran a voltajes sucesivamente más altos, como se señala por el signo "+". Un número creciente de electrones secundarios es generado en cada nivel. En este esquema, se produce en el ánodo una amplificación de 10 veces a la señal inicial. Muchos tubos fotomultiplicadores aumentan la señal varios miles de veces. (De: Simonson MG: In Kaplan LA, Pesce AJ, editors: *Nonisotopic alternatives to radioimmunoassay*, New York, 1981, Marcel Dekker.)

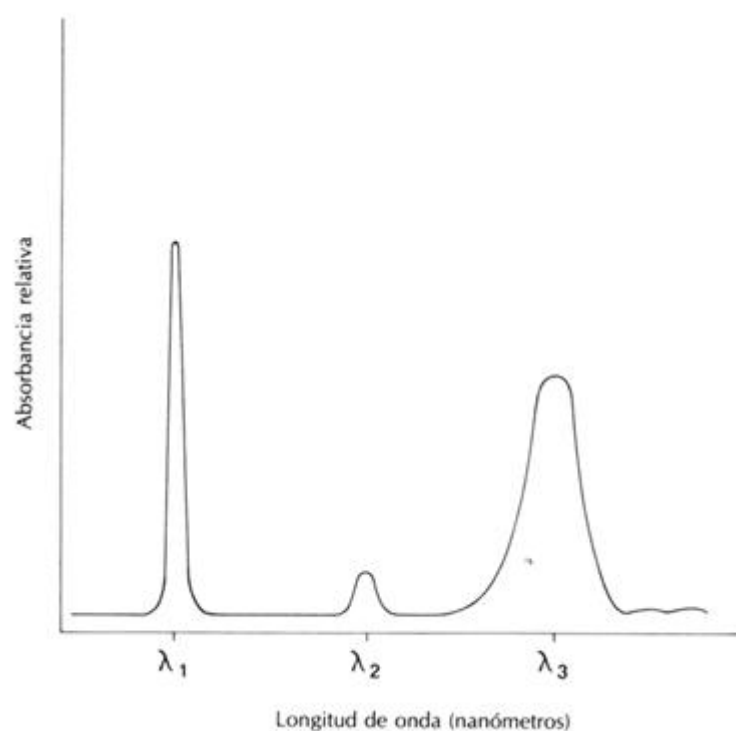


Figura 4-13 Esquema del espectro de absorción ideal. λ_1 , λ_2 y λ_3 representan las bandas de absorción de un cromóforo.

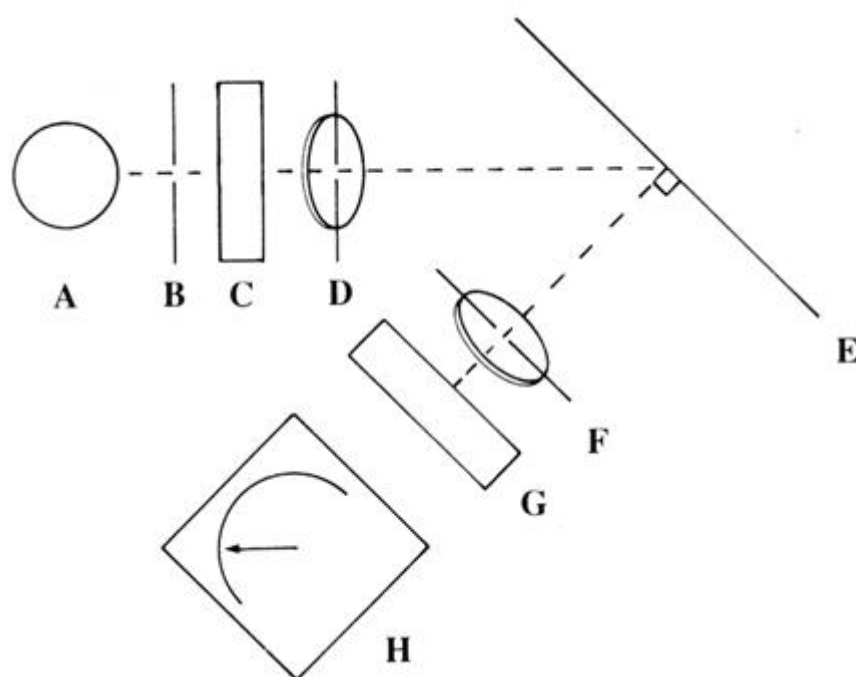


Figura 4-14 Diagrama de un espectrómetro de reflectancia: A, fuente de luz; B, hendidura; C, filtro o selector de longitud de onda; D, hendidura o lentes colimadores; E, superficie donde se realiza la prueba; F, hendidura o lentes colimadores; G, detector; H, dispositivo de lectura.

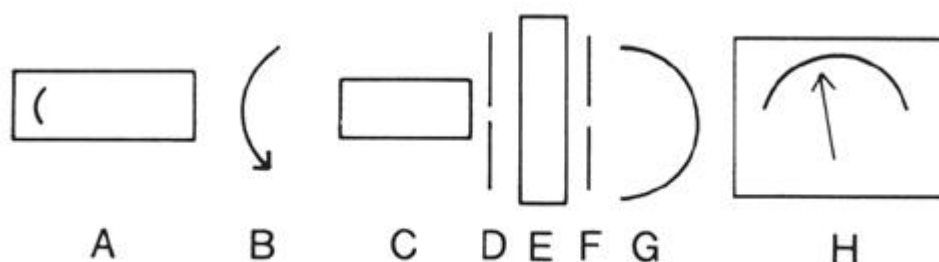


Figura 4-15 Componentes esenciales de un espectrómetro de absorción atómica. A, lámpara de cátodo hueco; B, "Chopper"; C, conjunto de quemador y llama; D, hendidura de entrada; E, selector de longitud de onda; F, hendidura de salida; G, detector; H, dispositivo de lectura.

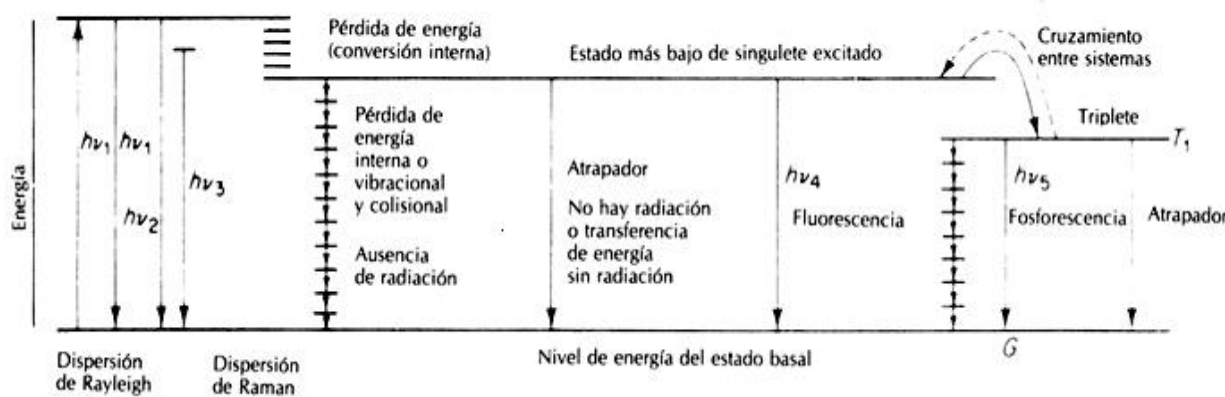


Figura 4-16 Esquema de muestra la conversión de la energía luminosa en diferentes formas de energía radiante y molecular. (De: Pesce AJ et al, editors: *Fluorescence spectroscopy*, New York, 1971, Marcel Dekker.)

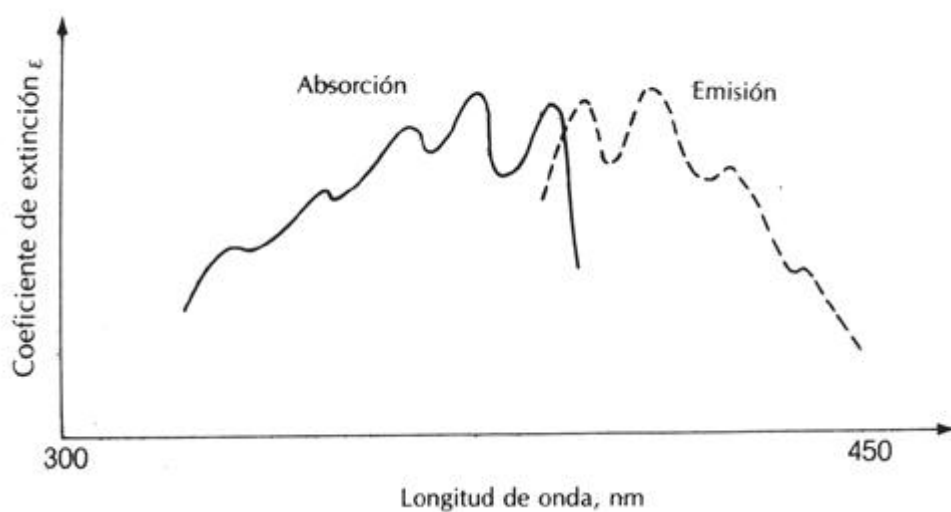


Figura 4-17 Espectro de Absorción (excitación) y emisión (fluorescencia) de un compuesto fluorescente. (De: Pesce AJ et al, editors: *Fluorescence spectroscopy*, New York, 1971, Marcel Dekker.)

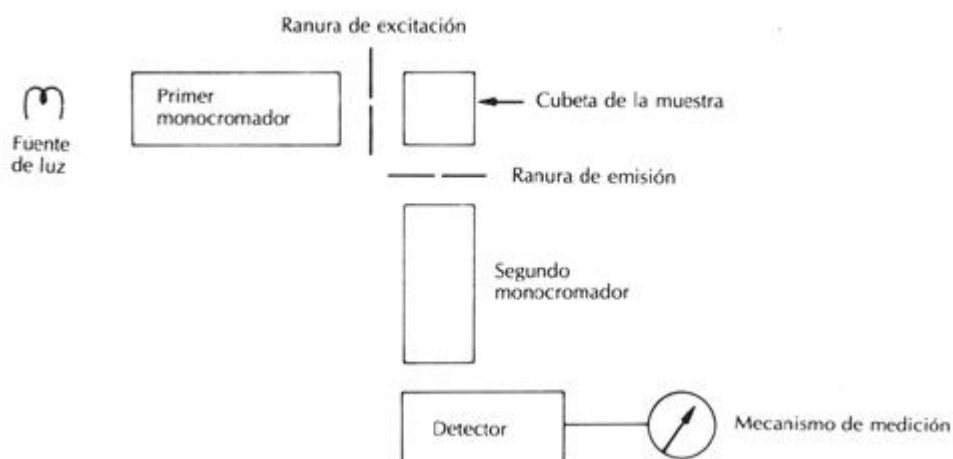


Figura 4-18 Componentes esenciales de un fluorómetro. (De: Brewer JM et al, editors: *Experimental techniques in biochemistry*, Englewood Cliffs, N.J., 1974, Prentice-Hall.)

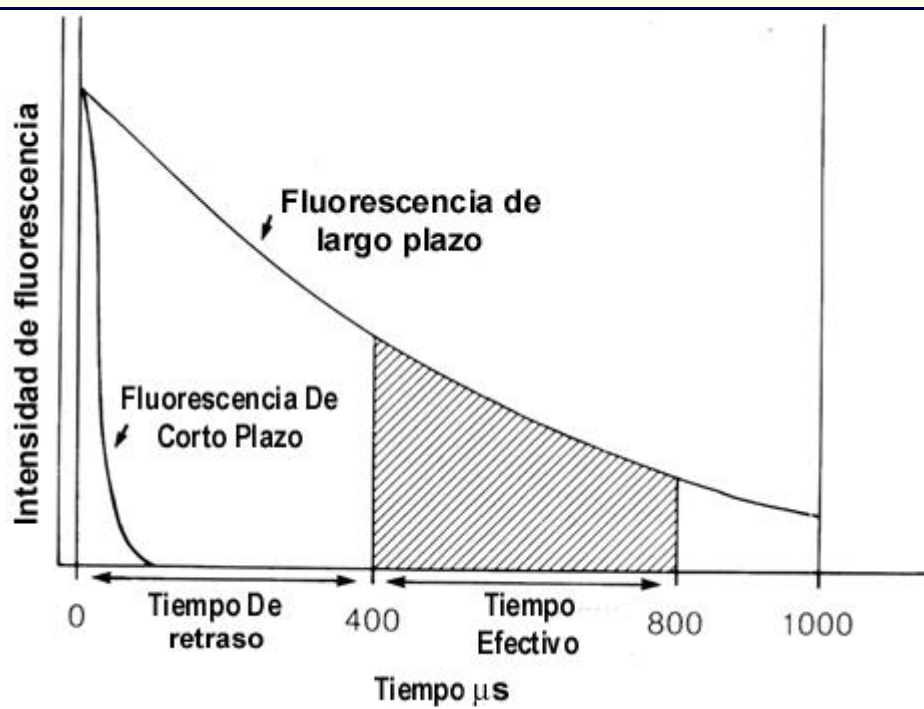
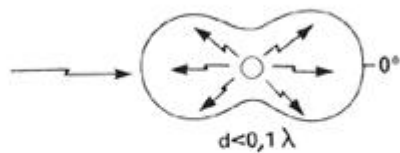


Figura 4-19 Esquema que muestra las diferencias entre fluorescencia de onda larga y corta.

- A** Partículas pequeñas
– luz dispersada simétricamente
pero mínima a 90° (Rayleigh)



- B** Partículas muy grandes
– luz dispersada en su mayor
parte hacia adelante (Mie)



- C** Partículas grandes
– luz dispersada mayormente
hacia adelante (Rayleigh-Debye)

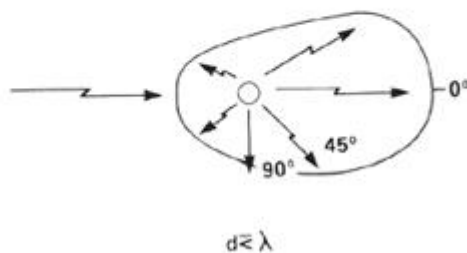


Figura 4-20 Efecto del tamaño de las partículas sobre la dispersión de la luz incidente en una solución homogénea. (De: Gauldie J: In Kaplan LA, Pesce AJ, editors: *Nonisotopic alternatives to radioimmunoassay*, New York, 1981, Marcel Dekker.)

Turbidimetría

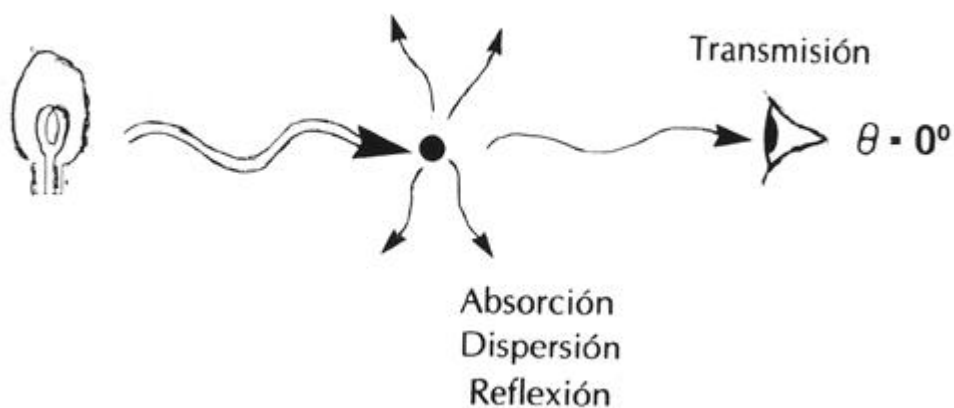


Figura 4-21 Esquema de las mediciones nefelométricas. (θ , ángulo de detección. (De: Gauldie J: In Kaplan LA, Pesce AJ, editors: *Nonisotopic alternatives to radioimmunoassay*, New York, 1981, Marcel Dekker.)

Nefelometría

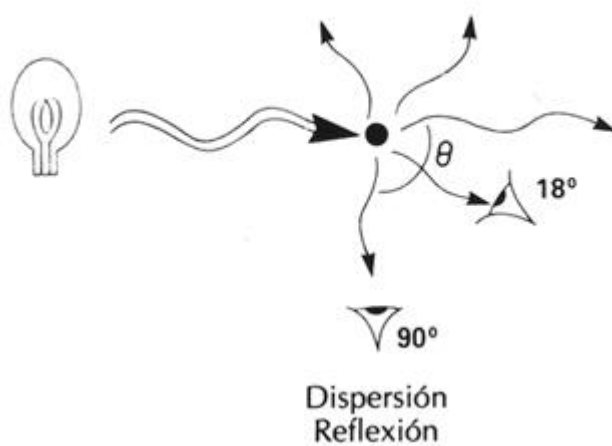


Figura 4-22 Esquema de las mediciones de turbidez. (θ , ángulo de detección. (De: Gauldie J: In Kaplan LA, Pesce AJ, editors: *Nonisotopic alternatives to radioimmunoassay*, New York, 1981, Marcel Dekker.)

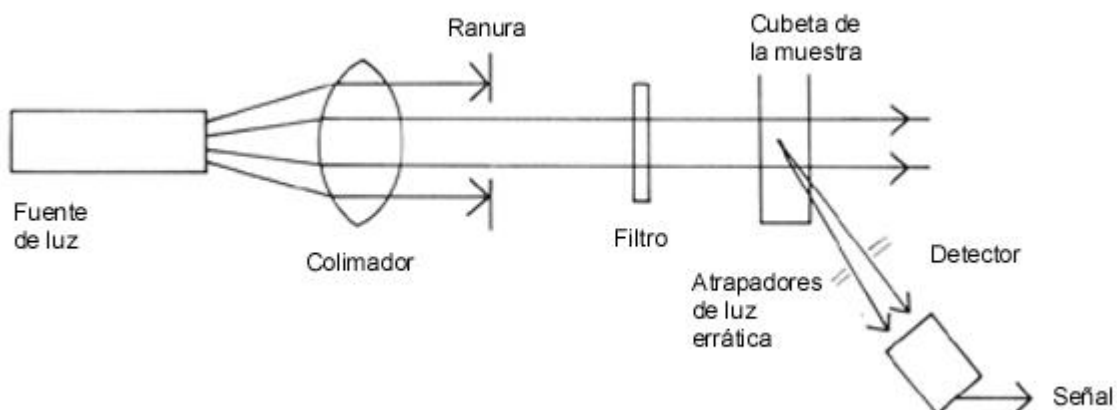


Figura 4-23 Diagrama de los componentes básicos de un nefelómetro.

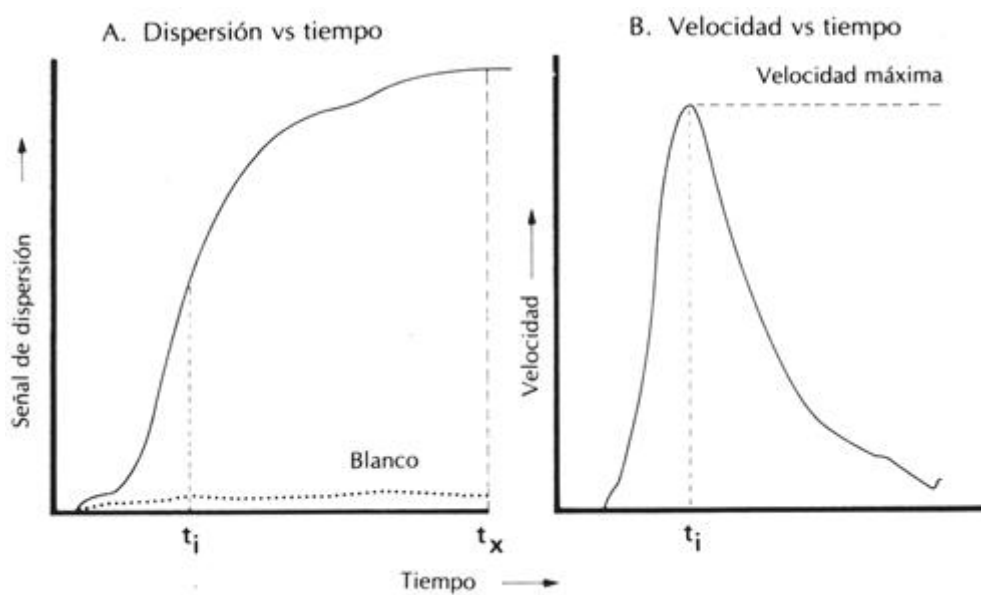


Figura 4-24 Análisis cinético de la dispersión luminosa. *Curva A*, intensidad de la luz dispersada en función del tiempo; *curva B*, velocidad de cambio de la luz dispersada en función del tiempo.

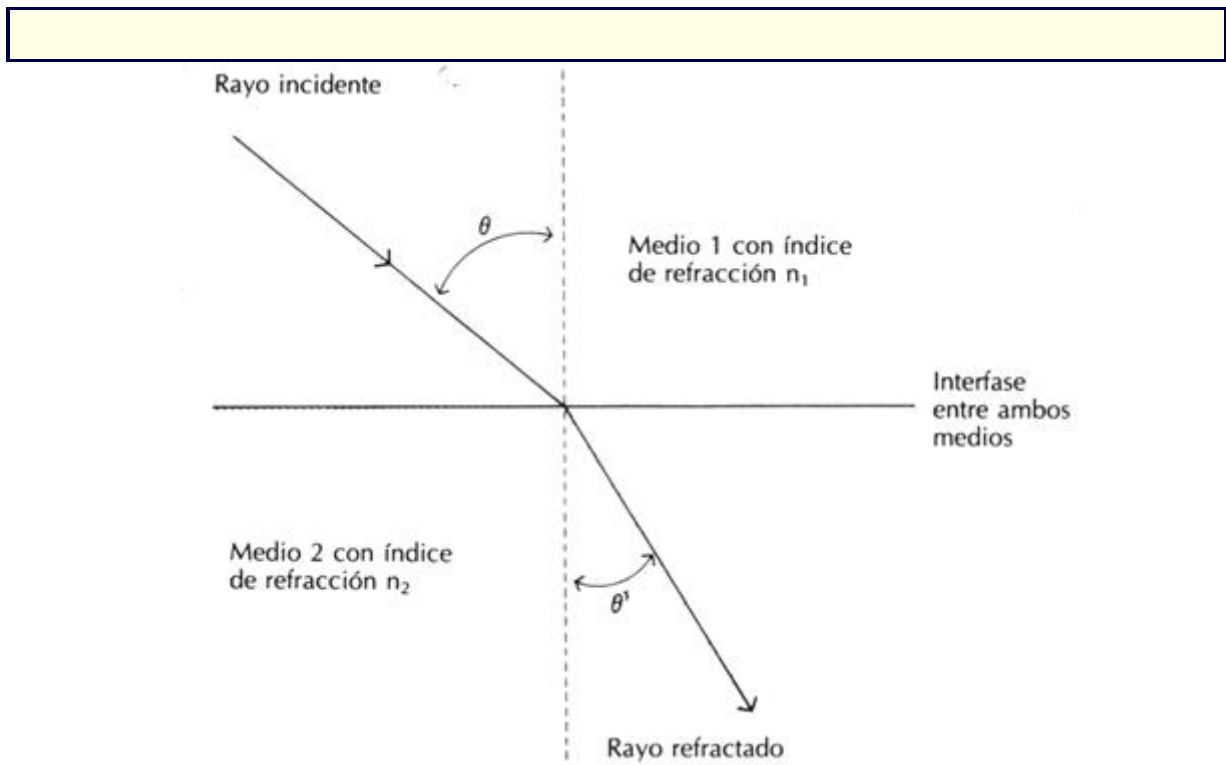


Figura 4-25 Diagrama que muestra la desviación de la luz cuando pasa de un medio de una densidad a otro de diferente densidad, con un ángulo de desviación θ' .

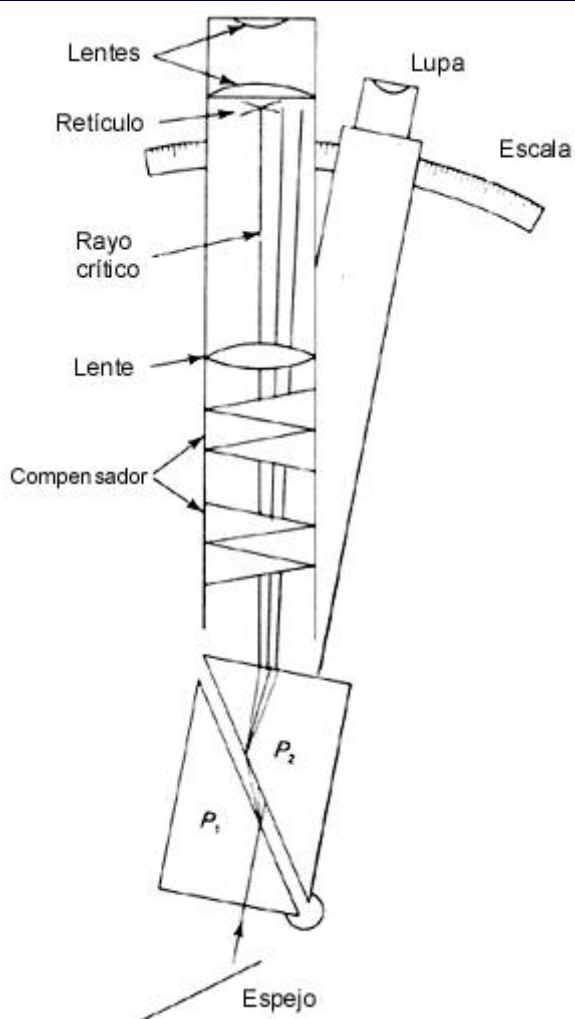


Figura 4-26 Esquema del refractómetro de Abbe (De: Shugar GJ, Shugar RA, Bauman L: *Chemical technicians' ready reference book*, New York, 1973, McGraw-Hill.)

CAPÍTULO 5

5. Cromatografía: Teoría y Práctica

M. Wilson Tabor

Divisiones de la cromatografía



Principios generales

Resolución

Platos teóricos

Retención

Selectividad

Mejoramiento de la resolución de picos

Polaridad

Polaridad y fuerza del solvente

Polaridad y selectividad de la fase estacionaria

Mecanismos de la cromatografía

Adsorción

Partición

Intercambio iónico

Cromatografía de penetración en gel (exclusión por tamaño molecular)

Preparación de muestras para cromatografía

Naturaleza del problema

Métodos mecánicos para el aislamiento inicial del compuesto analizado

Métodos cromatográficos para el aislamiento inicial del compuesto analizado

Métodos de extracción para el aislamiento de compuesto analizado

Procesamiento de los extractos de la muestra

OBJETIVOS

- Establecer los principios generales de la cromatografía y describir su aplicación a las divisiones y subdivisiones de la cromatografía, apoyando cada descripción con una ilustración del mecanismo.
- Establecer el efecto de cada uno de los siguientes parámetros cromatográficos en la resolución de una separación cromatográfica:
 1. Altura equivalente de un plato teórico
 2. Tiempo de retención
 3. Polaridad de la fase móvil
 4. R_f
- Describir los procesos de separación que participan en los siguientes tipos de cromatografía y enumerar la clase de moléculas que pueden ser separados por cada tipo:
 1. Adsorción
 2. Partición
 3. Intercambio de iones
 4. Penetración de gel
- Describir cuatro fuerzas fisicoquímicas que son centrales a la polaridad y explicar cómo la polaridad afecta el comportamiento cromatográfico de los compuestos en la cromatografía de fase normal y de fase inversa.
- Enumerar tres técnicas básicas para la preparación de muestras para cromatografía y proporcionar la base



de la purificación para cada técnica.

Términos clave

adsorción Proceso mediante el cual una sustancia se adhiere a otra debido a las fuerzas de atracción entre las superficies de los átomos de las dos sustancias (ver Fig. 5-13).

altura equivalente a un plato teórico (AETP) El número obtenido al dividir la duración de la columna por el número de platos teóricos (ver ecuación 5-4 y Fig. 5-7).

atracción electrostática La fuerza de atracción entre compuestos con cargas formales, positivas o negativas (ver Fig. 5-11, D).

banda Una zona cromatográfica, o sea, una región donde la sustancia separada está concentrada.

coeficiente de distribución de concentraciones en equilibrio (K_D) La razón de la concentración de un componente de la muestra en una fase a su concentración en una segunda fase en el equilibrio. Las dos fases pueden ser dos líquidos inmiscibles, o la fase móvil y la fase estacionaria (ver ecuación 5-1 y Fig. 5-3).

compuesto analizado La sustancia o el componente en una muestra que se está determinando.

cromatografía Un método de análisis, en el cual el flujo de una fase móvil (gaseosa o líquida) conteniendo la muestra, promueve la separación de los componentes de la muestra, que se distribuyen diferencialmente entre esta fase y una fase estacionaria. La fase estacionaria puede ser un sólido o un líquido recubierto o unido a un sólido.

cromatograma Una serie de bandas o zonas separadas que se detectan, ya sea visualmente, como en algunas separaciones cromatográficas en papel o en capa delgada, o indirectamente, mediante un sistema de detección. En el último caso, el sistema de detección normalmente genera una señal eléctrica, que se grafica como función del tiempo para mostrar la serie de bandas o zonas separadas.

dipolo La fuerza de atracción de compuestos con centros de cargas tanto positivas como negativas, que son el resultado de una distribución desigual de los electrones de enlace entre dos elementos del compuesto con diferencias grandes de electronegatividad (ver Fig. 5-11, B).

eficiencia Una medida del desempeño cromatográfico, generalmente asociada con el grado de definición de los picos en el cromatograma, que se cuantifica por el número, N , de platos teóricos de una columna (ver ecuación 5-3, Figs. 5-6 y 5-7 y Tabla 5-1).

elución El desplazamiento de un soluto de una fase estacionaria mediante el paso de una fase móvil apropiada.

emulsión Para una extracción líquido-líquido, es una mezcla que se forma cuando una de las fases líquidas inmiscibles se dispersa en forma de pequeñas gotas en la otra fase líquida inmiscible.

factor de capacidad La razón del volumen de elución de una sustancia al volumen muerto en la columna (ver ecuación 5-6 y Fig. 5-9, A).

fuerza dispersante Fuerza de atracción, a veces denominada *fuerzas de van der Waals* de las sustancias, que resulta de la inducción de un dipolo temporal dentro de la estructura de

un compuesto determinado (ver Fig. 5-11, A).

número de platos teóricos (N) Un número que define la eficiencia de la columna cromatográfica (ver ecuación 5-3 y Fig. 5-7).

partición Proceso por medio del cual un soluto se distribuye entre dos fases inmiscibles (ver Fig. 5-15).

pK_a El pK de un ácido; es el pH al cual la mitad está disociado.

puentes de hidrógeno La fuerza de atracción de los compuestos que se forma cuando un átomo de hidrógeno, unido covalentemente a un elemento electronegativo, como el oxígeno, nitrógeno, o azufre, tiene un grado importante de carácter positivo en relación con el átomo electronegativo, causando de ese modo que el compuesto tenga un dipolo grande (ver Fig. 5-11, C).

polaridad (P') Fuerzas de atracción que abarcan la interacción total de las moléculas del solvente con las moléculas de la muestra, y las moléculas del solvente o de la muestra con la fase estacionaria.

pico Una banda o zona en un cromatograma, que muestra un máximo de concentración de una substancia.

serie eluotrópica Serie de solventes o mezcla de solventes colocados en orden de su capacidad de eluir un soluto de un adsorbente.

resolución (R o R_s) El grado de separación cromatográfica entre dos componentes (ver ecuaciones 5-2, 5-8 y 5-10 y Fig. 5-5).

volumen de elución (V_e) El volumen de fase móvil requerido para eluir un soluto de una columna cromatográfica (ver ecuación 5-6 y Fig. 5-9, A).

R_f Un cociente usado en cromatografía de papel y en cromatografía de capa fina, que es la distancia del origen al centro de la zona separada, dividida entre la distancia del origen al frente del solvente (ver ecuación 5-9).

selectividad (α) Las razones de los factores de capacidad de dos sustancias medidas en condiciones cromatográficas idénticas; a veces se denomina *factor de separación*, o *selectividad cromatográfica* (ver ecuación 5-7 y Fig. 5-9, B).

tiempo de retención (t_R) El tiempo transcurrido desde la inyección de la muestra en el sistema cromatográfico al registro del pico máximo del componente en el cromatograma (ver Fig. 5-7).

volumen muerto (V) El volumen intersticial de la columna cromatográfica, o sea, el volumen de fase móvil embebido en los poros y alrededor de la fase estacionaria en una columna (ver ecuación 5-8 y Fig. 5-9, A).

La necesidad de análisis rápidos, reproducibles y exactos para muchas clases de compuestos analizados presentes en cantidades pequeñas, se está abordado actualmente en el laboratorio clínico, en gran parte como resultado del desarrollo de la cromatografía durante las dos últimas décadas. *Cromatografía* es un término colectivo que refiere a un grupo de procesos de separación mediante los cuales una mezcla de solutos, disueltos en un solvente común, se separan uno de otro debido a una distribución diferencial de los solutos entre dos fases. Una fase; el solvente, es móvil y lleva la mezcla de solutos a través de la otra fase; la fase fija o estacionaria. Los métodos cromatográficos abarcan un gran número de variaciones



en la técnica, en las cuales la fase móvil varía desde líquidos hasta gases y la fase estacionaria comprende desde las hojas de papel de celulosa hasta tubos capilares de vidrio, tan delgados como un cabello humano, que se recubren internamente con un complejo unido covalentemente o polímeros orgánicos complejos. Un examen somero de la bibliografía científica, muestra que tanto el número de métodos cromatográficos publicados, como sus aplicaciones han crecido exponencialmente.[refs\(153\)](#)

La cromatografía moderna empezó en 1906, cuando Michael S. Tswett describió su separación de clorofilas, usando una columna de carbonato de calcio (gis)[ref\(154\)](#) e introdujo un sistema de nomenclatura que ahora se aplica universalmente a la cromatografía (“descripción de colores,” de las palabras griegas, *krōma* o *khromatos*, que significa color y *graphō*, que significa dibujar, describir). Ésta fue la primera de muchas publicaciones sobre la colorida historia de la cromatografía.

Divisiones de la Cromatografía

Los métodos cromatográficos se clasifican en general según el estado físico de la fase acarreadora del soluto, o sea la fase móvil. Estas divisiones están representadas en las Figs. 5-1 y 5-2, como la cromatografía de gases y en solución, que se refieren a los estados respectivos; gaseoso y líquido de la fase móvil. En la Fig. 5-1, estas divisiones se clasifican además de acuerdo a la manera en que la matriz de la fase estacionaria está confinada, en un método cromatográfico particular. Por ejemplo, la cromatografía de solución está dividida en métodos de superficie plana y en columna, dependiendo de si la fase estacionaria es una capa delgada sostenida mecánicamente en una hoja, o si está empacada en una columna. El método plano de soporte puede incluir el uso de una hoja de papel, como la celulosa o una capa delgada sobre un soporte mecánico, como vidrio o plástico.

Los métodos de la columna se denominan clásicamente como *cromatografía de líquidos*. Además, los *métodos de columna* es una frase que se usa generalmente para subdividir la cromatografía de solución, en que la fase estacionaria está empacada dentro de un tubo de vidrio o de metal. Sin embargo, es importante señalar que la cromatografía de gases es estrictamente un método de columna, porque debe usarse una columna para contener la fase estacionaria (ver capítulo 7).

Las divisiones principales de la cromatografía, basadas en la fase móvil, también pueden subdividirse de acuerdo al mecanismo de interacción del soluto con la fase estacionaria (Fig. 5-2). Los dos mecanismos, que se encuentran más comúnmente en ambas separaciones de fase móvil; gaseosa y en solución, son la adsorción y la partición. La cromatografía de adsorción (líquido-sólido, [L/S] o gas-sólido [G/S]), es un proceso mediante el cual los solutos de una muestra son separados por sus diferencias de *atracción* con la fase estacionaria frente a la fase móvil. La cromatografía de partición (líquido-líquido, [L/L] o gas-líquido [G/L]), es un proceso mediante el cual los solutos de una muestra son separados por las diferencias de su *distribución* entre dos fases líquidas (L/L) o entre una fase gaseosa y una líquida (G/L). En ambos casos de cromatografía de partición, la fase estacionaria es líquida y la fase móvil es un líquido o un gas.

Otras divisiones mecánísticas de la cromatografía en solución son el intercambio de



iones y la penetración de gel. La cromatografía de intercambio iónico (“ionic exchange” o “IE”, en inglés) usa una matriz insoluble que contiene grupos iónicos covalentemente unidos a la fase estacionaria, los cuales puede intercambiar reversiblemente, ya sea con cationes o aniones de la fase móvil. La cromatografía de filtración de gel (“gel filtration” o “GF”, en inglés), se refiere a una fase estacionaria de un gel hidrofílico hinchado con solvente en forma de cuentas porosas, que se usa con una fase móvil de un solvente acuoso. La cromatografía de penetración de gel (“gel permeation” o “GP”, en inglés), se refiere a una fase estacionaria de un gel hidrofóbico hinchado con solvente en forma de cuentas porosas, que se usa con una fase móvil de un solvente orgánico. Tanto la cromatografía de GF como la de GP, a veces se denominan *cromatografía de exclusión (o inclusión) molecular* (ver pág. 122).

Los límites entre estos tipos mecanísticamente diferentes de cromatografía no están definidos, ya que para algunas separaciones cromatográficas puede estar operando más de un mecanismo. Por ejemplo, en la cromatografía de GF, las interacciones de adsorción entre las moléculas del soluto y la fase estacionaria son los más comunes, además del mecanismo predominante de exclusión por tamaño. Más adelante, se presentan con mayor detalle estos mecanismos, después de una breve discusión de la teoría y los principios cromatográficos.

Principios Generales

La base teórica de la cromatografía está bien desarrollada, tanto en los métodos de fase gaseosa como en solución, compartiendo los mismos fundamentos.^{ref(155)} Sólo se tratan unos cuantos conceptos generales de esta teoría en esta sección. Para las discusiones más extensas y referencias adicionales, por favor refiérase a las revisiones y libros representativos^{refs(156)} y a las revisiones del compendio de Química Analítica^{refs(157)} sobre técnicas cromatográficas especializadas.

La separación de una mezcla que contiene dos o más componentes, es una operación que tiene el objetivo de producir fracciones, donde cada fracción tiene una mayor concentración de un componente, en relación con los otros componentes presentes en la mezcla original. La base fisicoquímica de las técnicas de separación cromatográfica es principalmente el equilibrio de distribución.^{ref(158)} El equilibrio de distribución se refiere a las diferencias de solubilidad y adsorción de un componente en dos fases inmiscibles.

El equilibrio de separación puede visualizarse como la distribución de un soluto, S , entre dos fases inmiscibles, la fase superior (u) y la fase inferior (l), a temperatura y presión constante. La razón de las concentraciones del soluto en las dos fases determina la separación, que puede ser definida por un coeficiente de distribución de concentraciones en equilibrio, K_D , para las concentraciones molares, C_u y C_l , del soluto en las fases superiores e inferiores, respectivamente:

$$K_D = \frac{C_u}{C_l} \quad \text{Ec. 5-1}$$

La concentración molar se define en el sentido clásico, como el número de moles de soluto por unidad de volumen del solvente. A veces se denomina al coeficiente de distribución

como la *razón de partición*. En términos prácticos, una K_D de 1.0 significa que un 50% del soluto se distribuye en la fase superior y 50% se distribuye en la fase inferior (Fig. 5-3, A). Asimismo, un K_D de 9.0 significa que 90% del soluto se distribuye en la fase superior y 10% está en la fase inferior (Fig. 5-3, A).

Para una aplicación más generalizada de los coeficientes de distribución para cromatografía, podemos asumir que $C_l = C_m$, donde C_m se refiere a la cantidad del soluto distribuida en una cantidad unitaria de fase móvil, y asumir que $C_u = C_s$, donde C_s se refiere a la cantidad del soluto distribuido en una cantidad unitaria de fase estacionaria. En este caso más generalizado, los equilibrios de distribución para un soluto que está siendo separado en un sistema cromatográfico dado a temperatura constante (o sea, *isotérmico*), pueden ser ilustrados graficando la concentración del soluto en la fase móvil, C_m , contra la concentración en la fase estacionaria, C_s . Esto se llama *gráfica de la isoterma de adsorción-distribución* (Fig. 5-4, A). La pendiente de la isoterma es igual al coeficiente de distribución en equilibrio, K_D .

La forma resultante de una gráfica de la isoterma de distribución (Fig. 5-4, A) depende de varios factores. Ya que el movimiento del soluto entre la fase móvil y la fase estacionaria es un proceso de equilibrio termodinámico, el coeficiente de distribución en equilibrio, K_D , es dependiente tanto de la temperatura como de la presión. Sin embargo, la suposición anterior de que la temperatura y la presión no son factores contribuyentes en la situación bajo discusión, se hace generalmente para la mayoría de los procedimientos cromatográficos. Esta suposición y la base termodinámica general de la teoría de interacción entre el soluto y el solvente^{refs(159)} es válida solo para las soluciones diluidas del soluto en la fase móvil. Este tipo de situación existe en la cromatografía de gases convencional y en la cromatografía de líquidos de alta eficacia ("high performance liquid chromatography" o "HPLC", en inglés). Para estas separaciones, las isotermas de distribución se acercan a la linealidad, y los perfiles de concentración del soluto se asemejan una mancha circular discreta (Fig. 5-4, B) o a un pico de elución en forma de una campana simétrica (o sea, gaussiana) (Fig. 5-4, C1). Pero debe observarse que uno no puede predecir el comportamiento de cualquier muestra dada en cualquiera sistema cromatográfico particular.

La linealidad de las isotermas de distribución, según en la (Fig. 5-4, A1), es la excepción en lugar de la norma. En la mayoría de los casos, se observan isotermas de distribución convexas o cóncavas para las interacciones de la fase estacionarias con el soluto ((Fig. 5-4, A2 y A3 respectivamente). Varios factores influyen hasta el grado de que no se observa linealidad. A concentraciones altas del soluto en la fase móvil, no hay linealidad, ya que las bases termodinámicas de las interacciones soluto-solvente se cumplen solo para las soluciones diluidas. Otro factor es la complejidad de la muestra, esto es, la presencia de múltiples solutos. La interacción de estos componentes entre sí, causará una desviación de la linealidad.

Si se usan soluciones diluidas o no hay ninguna interacción soluto-soluto, puede observarse una Langmuir, o isoterma convexa (Fig. 5-4, A2). Esta isoterma muestra que el número limitado de sitios de adsorción en la fase estacionaria, vienen a ser ocupados por el soluto a medida que la concentración de éste aumenta, de ese modo pierden su capacidad para adsorber en proporción al aumento total de la concentración del soluto. Por consiguiente, el perfil de elución del soluto resultante (Fig. 5-4, B2 y C2) se caracteriza por un borde frontal



agudo, que indica una concentración alta de soluto. El límite trasero del patrón de elución del soluto disminuye asimétricamente del pico.

Cuando el soluto es adsorbido deficientemente a la fase estacionaria, prefiriendo la fase móvil, se observa la antiLangmuir, o isoterma cóncava (Fig. 5-4, A3). En esta situación, el perfil de elución del soluto resultante (Fig. 5-4, B3 y 5-4, C3) se caracteriza por un borde frontal inclinado (o sea, concentración baja de soluto) y bordes traseros agudos (o sea, concentración alta de soluto). Además, el volumen de elución del soluto depende del tamaño de la muestra.

Resolución

La meta máxima de cualquier técnica cromatográfica dada, es separar los componentes de una muestra dada en un tiempo razonable. La finalidad de tal separación es detectar o cuantificar un componente particular o grupo de componentes de interés en forma pura. La capacidad de resolver los componentes entre sí y el grado en que esta resolución se obtiene, son medidas de que tan apropiada es la separación cromatográfica. El tópico de que tan adecuada es la resolución para una muestra dada es discutido por Snyder.[ref\(160\)](#) Uno puede responder esta pregunta al definir los objetivos de la separación cromatográfica. En general, los objetivos para el analista en un laboratorio químico dependen de las siguientes preguntas. (1) Existe una sustancia particular presente en una muestra; o sea, ¿debe hacerse un análisis cualitativo? (2) Cuánto de una sustancia particular está presente en una muestra; o sea, ¿debe realizarse un análisis cuantitativo.[ref\(161\)](#) En la siguiente discusión de la teoría de la resolución, se hará énfasis (e ilustraciones correspondientes) en las técnicas de columna, de gas o líquida, en lugar de en los métodos de superficies planas.

Observe que, por convención, las concentraciones de los solutos separados en un sistema cromatográfico se grafican contra unidades de volumen de elución, o de distancia. Las bandas o las zonas de los compuestos analizados separados se refieren generalmente como un *pico*

En la Fig. 5-5 se muestra una separación cromatográfica real de una mezcla de tres componentes por cromatografía de líquidos de alta eficacia, indicando los parámetros importantes para la evaluación de la resolución, R . La cantidad R para dos componentes se define como la distancia, d , entre los centros de dos picos dividida por la anchura promedio de la base, W , de los picos

$$R = \frac{d_2 - d_1}{1/2 (W_1 + W_2)} \quad \text{Ec. 5-2}$$

Para este cálculo, tanto la distancia, d , como la anchura máxima, W , se miden en las mismas unidades. Este método para calcular la resolución, se basa en la suposición de que las isotermas de distribución de los componentes que están siendo separados, se acercan a la linealidad (Fig. 5-4, A) en condiciones específicas. El conjunto de condiciones específicas son la fase móvil, la fase estacionaria y el rango de concentraciones del soluto.

Un valor resolución de 1.25 o mayor, se requiere para obtener buenos análisis



cromatográficos cuantitativos o cualitativos. Si la resolución es 0.4 ó menos, la forma del pico no muestra claramente la presencia de dos o más componentes. El valor real de la resolución depende de dos factores: la anchura del pico y la distancia entre los máximos de los picos, para las separaciones por columna, o el diámetro de las manchas circulares y la distancia entre estas manchas, para las separaciones por el método de superficie plana.

Estos factores determinantes de la resolución, también son indicativos de la eficiencia del proceso cromatográfico. La eficiencia es reducida por el ensanchamiento de la banda del soluto a medida que éste migra a través la fase estacionaria. Si el ensanchamiento ocurre en un grado significativo durante el proceso cromatográfico, los picos resultantes serán anchos, o las manchas resultantes serán difusas. Así pues, la separación de los componentes es deficiente, y se reduce la sensibilidad de la detección. Un ejemplo de separación de alta eficiencia contra una de baja eficiencia se ilustra en el Fig. 5-6, tanto para separaciones en columna como por el método de superficie plana.

El ensanchamiento de la banda del soluto ocurre durante el proceso cromatográfico real y puede describirse que procede como una separación en columna. La muestra se introduce en la fase móvil, en un volumen pequeño de solvente, en un punto cerca del extremo de la entrada de la columna. Una vez que ha entrado en la columna, la muestra empieza a dispersarse mediante procesos de difusión térmica, que continúan a medida que pasa a través de la columna. Mientras mayor sea el tiempo que pasa una banda de soluto en la columna (o sea, mayor tiempo de retención), mayor será la probabilidad de que ocurra difusión térmica y mayor dispersión de bandas. El resultado es la presencia de picos de elución más amplios pero gaussianos (simétricos, como en la Fig. 5-4, C1) para los solutos que se retienen más. Este proceso es similar en los métodos de cromatografía de superficie plana, dando lugar a manchas de diámetro mayor pero simétricas, como en la Fig. 5-4, B1, para los solutos más retenidos. Varios factores adicionales contribuyen al ensanchamiento de la banda del soluto.^{ref(162)} Éstos, incluyen regiones no uniformes de la fase estacionaria, distribución no uniforme del tamaño de partícula, y empaque no uniforme de la columna, que puede causar un paso no uniforme de las moléculas del soluto. En el último caso, algunas moléculas pasan más tiempo en el sistema de separación que otras; o sea, tienen un camino más largo. Estos procesos dan lugar a una dispersión más amplia, no gaussiana de las bandas del soluto, como los picos de elución asimétricos o manchas barridas, según muestra la Fig. 5-4, C2 y 5-4, B2, respectivamente.

Por consiguiente una manera de maximizar la eficiencia de la columna (o sea, disminuir el grado de ensanchamiento de la banda) es usar una columna de cromatografía bien empacada que contenga un empaque de fase estacionaria que no sólo sea de tamaño pequeño, sino también uniforme en la distribución de tamaños de las partículas. Las columnas que satisfacen estos criterios se obtienen fácilmente hoy en día de numerosas fuentes comerciales.

Platos teóricos

Uno puede obtener una evaluación numérica de la eficiencia de la columna al calcular el número de platos teóricos, N , para una columna dada. Un plato teórico es un segmento microscópico de una columna, donde se supone que existe un equilibrio perfecto del soluto entre las fases móvil y estacionaria. Es la unidad de separación más pequeña, teórica, en una columna. La teoría se originó con Martin y Synge^{ref(163)} en su tratamiento matemático del



proceso cromatográfico. El número de platos teóricos puede calcularse para una columna directamente de un cromatograma (Fig. 5-7) mediante:

$$N = 16 (t_R/W)^2 \quad \text{Ec. 5-3}$$

En esta expresión, W es la anchura de la base del pico cromatográfico y t_R es el tiempo de retención del soluto, o sea, el tiempo desde la introducción de la muestra en la columna al ápice del pico del soluto que se está eluyendo. Tanto t_R como W deben medirse en las mismas unidades, como tiempo o distancia. (note que N es adimensional.) Un número grande de platos teóricos indica picos relativamente estrechos, o sea, una columna eficiente y mejor resolución.

Relacionada con el número de platos teóricos, está la altura de la columna equivalente a un plato teórico, AETP ("height equivalent to a theoretical plate" o "HETP", en inglés), que puede calcularse mediante la siguiente ecuación:

$$\text{AETP} = \frac{L}{N} \quad \text{Ec. 5-4}$$

En esta ecuación, L equivale a la longitud de la columna, generalmente en milímetros. La máxima eficiencia de la columna se obtiene cuando la AETP es lo más pequeña posible.

Además de los factores que afectan a la eficiencia de la columna, N es afectado por la velocidad de flujo de la fase móvil. La velocidad lineal de la fase móvil, μ , puede calcularse por:

$$\mu = \frac{L}{t_0} \quad \text{Ec. 5-5}$$

En esta ecuación, L es la longitud de la columna, y t_0 es el tiempo que tarda una porción discreta del solvente en fluir a través de la columna. Una gráfica de la AETP contra μ muestra la relación experimental de estas dos variables en la cromatografía de gases ("gas chromatography" o "GC", en inglés) (Fig. 5-8, A) y en la cromatografía de líquidos ("liquid chromatography" o "LC", en inglés) (Fig. 5-8, B). La velocidad de flujo óptima, μ_{opt} , se obtiene a una AETP mínima. Para la cromatografía de gases (Fig. 5-8, A) esta gráfica se conoce mejor como la gráfica de van Deemter. [ref\(164\)](#)

A velocidades altas de la fase móvil, la AETP varía linealmente con μ en la cromatografía de gases (Fig. 5-8, A), pero en la cromatografía de líquidos (Fig. 5-8, B) rara vez se observa un mínimo en la AETP, y ésta tiende a estabilizarse en valores altos de μ . En la práctica, las velocidades de la fase móvil en la GC son generalmente entre uno y dos órdenes de magnitud mayores que los de la LC. Para la LC, son necesarias velocidades y eficiencias de la columna menores debido al papel activo que juega la fase móvil en el proceso de separación cromatográfica. Por consiguiente, para mejorar la eficiencia de separación en la LC, uno utiliza partículas de fase estacionaria más pequeñas, generalmente de un décimo a un centésimo del tamaño de aquellas que se usan en la GC.



Retención

La resolución depende de otros factores además de los platos teóricos. Uno de estos es la razón de los volúmenes de las fases móvil y estacionaria en la columna, o sea el factor de capacidad, k , el cual puede calcularse del cromatograma (Fig. 5-9, A) por medio de la ecuación

$$k' = \frac{V_e - V_0}{V_0} = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad \text{Ec. 5-6}$$

Los volúmenes en esta ecuación, son el volumen muerto, V_0 , de la columna, o sea el volumen de la fase móvil en la columna y el volumen de elución, V_e , de un soluto retenido por la fase estacionaria durante una corrida cromatográfica. El cromatograma de HPLC en la Fig. 5-9, A, fue obtenido por la inyección de una muestra que contiene dos solutos, de los cuales el primero no fue retenido por la fase estacionaria y el segundo se retuvo, siendo objeto del proceso de cromatografía. Entonces, los volúmenes, V_0 y V_e , se midieron del punto de inyección al ápice del pico de cada componente. Como se indicó anteriormente, el factor de capacidad puede calcularse también mediante la medición de los tiempos, t_0 y t_R , desde la inyección de muestras al ápice del pico del componente no retenido y del pico del componente retenido, respectivamente.

Valores pequeños de k' indican que los componentes de la muestra son retenidos en menor grado por la fase estacionaria y eluyen cerca del pico no retenido. Valores grandes de k' indican que los componentes de la muestra son retenidos fuertemente por la fase estacionaria y que se requieren análisis con tiempos largos. Para esta última situación, uno debe recordar que el ensanchamiento de la banda del soluto aumenta con el tiempo de residencia en la columna, debido a una mayor difusión del soluto. Por consiguiente los picos resultantes de la elución serán amplios y difusos, disminuyendo la sensibilidad y haciendo difícil la detección.

El valor de k' para un soluto particular es constante para cualquiera sistema cromatográfico dado, para composiciones constantes de la fase móvil, así como para tamaño y composición constantes de la fase estacionaria. Dentro de estos límites, el factor de capacidad no varía ni con la velocidad de flujo de la fase móvil ni con las dimensiones de la columna, o sea la longitud y el diámetro.

Selectividad

Otro parámetro del cual depende la resolución es el factor de selectividad, α , un término que describe la capacidad de un sistema cromatográfico para separar dos solutos. Es la razón de los factores de capacidad para dos solutos:

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} \quad \text{Ec. 5-7}$$



Los factores de capacidad para dos solutos se determinan como se muestra en la Fig. 5-9, B, de la cual puede calcularse la selectividad resultante del sistema. La selectividad de cualquier columna dada para la muestra, depende del proceso de intercambio de solutos entre la fase móvil y la fase estacionaria.^{ref(165)} Por consiguiente, para modificar la selectividad, uno puede cambiar la composición química, ya sea de la fase móvil o de la fase estacionaria a fin de aumentar la preferencia del soluto por una fase o la otra. En la LC, los cambios ya sea en la fase estacionaria o en la fase móvil, se hacen generalmente para mejorar la selectividad. Sin embargo, en la GC los cambios en la química de fase estacionaria se usan para mejorar la selectividad.

Optimización de la resolución máxima

Resolución general de picos.

Con la definición de los factores que afectan la resolución, ahora puede escribirse una ecuación más fundamental:

Ec. 5-8 missing

Por consiguiente la resolución de cualquier par de solutos en un sistema cromatográfico dado depende de tres factores: (1) número de platos teóricos, N , que es un factor de la eficiencia de la columna; (2) un factor de selectividad, α ; y (3) un factor de capacidad, k' .

Una relación similar puede derivarse para los métodos de cromatografía en superficie plana.^{ref(166)} Sin embargo, existe una diferencia importante entre los métodos de cromatografía planos y de columna. En un método cromatográfico de columna, los solutos en una muestra determinada pasan completamente a través de la cama de la fase estacionaria. Pero en un método plano de cromatografía, el proceso de separación se detiene cuando la fase móvil ha alcanzado el final de la cama de la fase estacionaria, dando lugar a que las bandas del soluto migren a través de una porción de la cama únicamente (Fig. 5-10). Para este tipo de separación, la retención del soluto se mide en función del valor de R_f , que es la distancia, d_2 , migrada por el soluto, dividido entre la distancia, d_1 , migrada por la fase móvil, o frente del solvente. Esta relación puede ser expresada como:

$$R_f = \frac{d_2}{d_1} \quad \text{Ec. 5-9}$$

Teniendo en cuenta esta característica esencial de los métodos planos de cromatografía, la ecuación de la resolución para la separación de dos solutos viene a ser la siguiente:

$$R = \left(\frac{N^{0.5}}{4} \right) \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k_2'}{(1 - k_2')^{2/3}} \right) \quad \text{Ec. 5-10}$$

Los términos de esta ecuación se definieron anteriormente. La pregunta de la

importancia práctica de las ecuaciones de la resolución pueden abordarse ahora. ¿Específicamente, cómo se relacionan estas ecuaciones con la resolución de las condiciones experimentales reales de la separación cromatográfica y el diseño físico de un aparato cromatográfico particular? Los tres parámetros fundamentales, N , α , y k' , de la resolución puede ajustarse más o menos independientemente de sí mismos.

Variación de N para optimizar la resolución.

La dinámica o velocidades de los diversos procesos físicos que ocurren durante la separación determinan N . Experimentalmente, uno puede cambiar N al ajustar o variar diversos parámetros o condiciones. Hay que recordar que al duplicarse del valor de N , la resolución aumentará por un factor de 1.4. (Note que en la ecuación de la resolución, R es proporcional a la raíz cuadrada de N). Los parámetros experimentales que pueden cambiarse para optimizar N se resumen en la Tabla 5-1.

Variación del factor de capacidad k' para optimizar la resolución.

La temperatura es un parámetro que se puede modificar para efectuar un cambio en el factor de capacidad. Ya que las interacciones fase estacionaria-soluto son dependiente de la temperatura, un cambio en este parámetro afectará la retención del soluto. Esto es especialmente importante en la GC, pero también es importante, aunque en un grado mucho menor, para otras técnicas cromatográficas.

Una segunda manera de variar el factor de capacidad es efectuar cambios en la fuerza de la fase estacionaria. En la cromatografía de partición, el aumento del porcentaje de recubrimiento de la fase líquida en el soporte de la matriz causará un aumento de k' . La mayoría de los análisis de cromatografía de líquido-gas ("gas liquid chromatography" o "GLC", en inglés) se hacen en columnas que contienen de 2% a 10% de la razón de del recubrimiento entre la fase líquida y el soporte de la matriz de la fase estacionaria.^{refs(167)} En virtud de que el tiempo de retención es proporcional a la cantidad de fase líquida presente, razones más bajas de porcentajes implican tiempos de análisis más cortos. Sin embargo, porcentajes mayores de fase estacionaria en la cromatografía de partición significan una resolución mayor. Por consiguiente la selección final del porcentaje de fase estacionaria debe ser un compromiso entre el tiempo de análisis y la resolución.

Además, uno puede variar el factor de capacidad, k' , para mejorar la resolución al cambiar la fuerza del solvente de la fase móvil, pero esto es aplicable sólo a los métodos de LC (ver pág. 118). En la GC, la fase móvil es un gas inerte como el helio o el nitrógeno, pero en la LC la fase móvil es un componente activo del procedimiento cromatográfico, que varía de acuerdo a la fuerza del solvente, desde los de baja polaridad, como el hexano, hasta los muy polares, como el agua,.

Para las modalidades adsorción y partición de la LC (Fig. 5-2), el proceso cromatográfico incluye una distribución continua de las moléculas del soluto entre la fase móvil y la estacionaria. Cualquier cambio en el coeficiente de distribución de concentraciones en equilibrio (K_D) afecta el factor de capacidad; o sea el volumen de elución por tiempo de un soluto particular en la muestra. Una manera de desplazar este coeficiente es aumentar o reducir la polaridad de la fase móvil en relación con la fase estacionaria. Pueden darse numerosos ejemplos de las modificaciones de la fase móvil. Esto es una técnica potente para variar el k' de los solutos que se están separando (ver pág. 131, capítulo 6).



Variación de la selectividad para optimizar la resolución.

Después de la optimización de los valores de k' , la selectividad o factor de separación, α , puede entonces ajustarse para maximizar la resolución. En general, el factor de separación es modificado por los cambios en la química de la fase móvil, la fase estacionaria o la muestra. Estos cambios pueden realizarse del siguiente modo.

Obtención de derivados.

La forma química de la muestra puede modificarse en una variedad de formas para afectar la selectividad. El método más común es la obtención de derivados. Knapp^{ref(168)} ha resumido una extensa variedad de reacciones de obtención de derivados para la separación de muestras por GC. La obtención de derivados no solo se usa en GC para mejorar la volatilidad de la muestra o los límites de detección del soluto, sino también para mejorar la selectividad.^{ref(169)} En la LC, las técnicas de obtención de derivados se usan en general para mejorar la detección,^{refs(170)} cuya colección más extensa de los métodos está presentada en el libro de Frei y Lawrence.^{ref(171)}

Alteraciones en la química de la fase móvil

Otro método para mejorar el factor de separación en la LC consiste en la alteración de la química de la fase móvil.^{ref(172)} Los cambios de polaridad del solvente pueden usarse para mejorar el factor de capacidad k' . Para mejorar el factor de separación, se intercambian los solventes de polaridad similar (fuerza) pero de diferente naturaleza química, sin afectar a la polaridad global de la fase móvil, dando lugar a cambios en la selectividad solvente. Por ejemplo, la resolución de una separación de HPLC inicialmente desarrollada con una fase móvil de cloruro de metileno hasta hexano, 50/50 por volumen, se pudo mejorar mediante la sustitución de tetrahidrofurano por el cloruro de metileno sin cambiar la fuerza solvente.^{refs(173)} La razón del mejoramiento en la resolución, sería que el tetrahidrofurano tiene una selectividad muy diferente hacia cierta clase de compuestos, como los lípidos, que el cloruro de metileno no tiene. En este caso, con la sustitución de un éter por un haluro orgánico, se han alterado los grupos funcionales de la fase móvil. El cambio de la funcionalidad del solvente sin cambiar la fuerza de éste, es una técnica eficaz para mejorar la selectividad, y por lo tanto la resolución en LC. Dependiendo de la muestra y los requerimientos cromatográficos y del detector, hay una extensa gama de opciones para la elección del solvente o solventes que pueden usarse para efectuar los cambios en la selectividad, según detalla Snyder^{ref(174)} en su compendio de las propiedades de 911 solventes. Una discusión adicional de las propiedades de los solventes se presenta en una sección posterior.

Alteraciones en la química de fase estacionaria

De la misma manera que se usan los ajustes en la funcionalidad de la fase móvil para mejorar el factor de separación en LC, comúnmente se usan cambios semejantes en la funcionalidad de la fase estacionaria para mejorar el factor de separación en la GC. Por ejemplo, muchas fases estacionarias de poliéster, como el succinato de etilen glicol, pueden ser reemplazadas por fases estacionarias de cianopropil silicon, como Silar 10C, las cuales permiten un cambio en la funcionalidad con poco o ningún cambio en la polaridad. Para las fases estacionarias relativamente no polares, pueden reemplazarse fácilmente las fases de



hidrocarburos, como Apiezon N, por las fases de alquil silicon, como OV-1, para obtener un cambio en la funcionalidad. Estos cambios en la fase estacionaria permiten un mejoramiento en la selectividad, conduciendo de ese modo a una optimización en la resolución. Los detalles en cuanto a la elección inicial de la fase se tratan en las siguientes secciones.

Polaridad

En las secciones anteriores, se trató la importancia de la fuerza del solvente y la fuerza de la fase estacionaria en relación a su efecto sobre la resolución. Ambos factores afectan la resolución cromatográfica al alterar el factor de capacidad y el factor de separación, según se describió antes en las ecuaciones 5-6 y 5-7. Estos parámetros están relacionados por el *principio de polaridad*.

El papel de la polaridad es central para la interacción de las moléculas en el estado líquido o gaseoso, y la polaridad es una propiedad determinante en el proceso cromatográfico en general. El concepto de la polaridad puede interpretarse de varias maneras,[refs\(175\)](#) aunque en general se considera que abarca la interacción total de las moléculas de solvente con las moléculas de la muestra, así como las moléculas del solvente o de la muestra con la fase estacionaria. La base fisicoquímica de la polaridad es la interacción de las fuerzas de atracción que existen entre las moléculas. Estas cuatro fuerzas de atracción se denominan más específicamente como interacciones dispersivas, dipolares, puentes de hidrógeno, y dieléctricas. Como se ilustra en la Fig. 5-11 y se discute más adelante, estas cuatro interacciones incluyen la atracción de cargas inducidas, parciales, o formales, tanto positivas como negativas.

Las interacciones de dispersión de las moléculas, a veces denominadas *fuerzas de van der Waals*, se refieren a la atracción inducida entre dos moléculas. Esta separación temporal de cargas opuestas (dipolo) en una molécula induce la polarización de electrones en una molécula adyacente, causando de ese modo que las dos moléculas se atraigan entre si por las interacciones electrostáticas (Fig. 5-11, A). La formación temporal de dipolos en las moléculas es la base física de la existencia de muchos compuestos en el estado líquido, formados por elementos con pequeñas diferencias de electronegatividad, por ejemplo, los elementos carbono e hidrógeno. En general, las interacciones dispersivas son un determinante importante en la polaridad sólo cuando faltan otras fuerzas o cuando algunos constituyentes elementales de las moléculas son especies ricas en electrones (como los halógenos en los halohidrocarburos).

Algunas moléculas poseen dipolos permanentes en lugar de temporales (Fig. 5-11, B). Estos compuestos tienen centros de la carga positiva y negativa, que son el resultado de una distribución desigual de los electrones de enlace entre dos elementos con diferencias grandes de electronegatividad dentro de la misma molécula. Este dipolo molecular global es aumentado por la presencia de pares de electrones elementales no unidos dentro de un compuesto. Estos son los electrones de la capa externa de un elemento que están apareados. Los elementos como el oxígeno, el azufre, los halógenos, y el nitrógeno poseen electrones no unidos cuando se unen covalentemente a otros átomos en los compuestos. El dipolo permanente resultante es direccional, donde un extremo de la molécula es parcialmente



positivo y el otro es parcialmente negativo.

Una categoría especial de moléculas dipolares está compuesta de aquellas que tienen hidrógeno covalentemente unido a un elemento electronegativo, como el oxígeno, el nitrógeno, o el azufre. En estas moléculas el hidrógeno tiene un grado importante de carácter positivo en relación con el átomo electronegativo al cual están unidas. Debido al pequeño tamaño del átomo de hidrógeno comparado con otros átomos, este extremo positivo del dipolo puede acercarse al extremo negativo de un dipolo vecino. La fuerza de atracción entre ambos es bastante grande, cerca de 10 veces el valor de las interacciones dipolares normales. Este caso especial de interacciones dipolo-dipolo se denomina *puentes de hidrógeno* y es uno de las clases más importantes de fuerzas de atracción débiles. Estos enlaces se ilustran en la Fig. 5-11, C, para el metanol.

El cuarto tipo de fuerza atracción es la interacción electrostática o dieléctrica. En este caso, la molécula del soluto de la fase móvil es una especie iónica cargada que tiene una carga formal, positiva o negativa. Un pequeño contraión, como el H^+ o el Cl^- , está presente pero generalmente está separado del soluto cargado o de la fase estacionaria, debido a la solvatación por la fase móvil (Fig. 5-11, D). Estas especies iónicas aumentan el carácter dipolar del solvente mediante un incremento de la polarización. Las interacciones dieléctricas son muy fuertes y favorecen la disolución de las moléculas de la muestra iónicas o ionizables en los solventes fuertemente dipolares, como el agua o el metanol.

La polaridad de una molécula de soluto es el resultado de las cuatro fuerzas de atracción descritas anteriormente. La polaridad de una molécula afectará sus interacciones con las fases móvil y estacionaria. Las moléculas más polares tienen esta propiedad debido principalmente a dipolos fuertes, un carácter iónico, la capacidad para formar enlaces fuertes de hidrógeno, o una combinación de las tres fuerzas. Las moléculas menos polares tienen fuerzas dispersivas como la base primaria de su interacción y una capacidad muy débil de interactuar mediante fuerzas dipolares, puentes de hidrógeno, o dieléctricas. Los aspectos prácticos de estas fuerzas interactivas y el grado de polaridad, forman la base de los mecanismos de la cromatografía. El papel de la polaridad en estos mecanismos se discute más adelante para cada uno de los tres constituyentes cromatográficos: el soluto, el solvente o fase móvil, y la fase estacionaria.

Polaridad y fuerza del solvente

La fuerza solvente en la cromatografía de líquidos es una medida de la capacidad de la fase móvil de competir con las moléculas del soluto por los sitios activos (o sea, sitios de interacción o de atracción) de la fase estacionaria. Cuando la fase estacionaria es sílica gel, los sitios activos son los grupos hidroxilo sumamente polares ($Si-OH$). Por consiguiente, en este caso, la fuerza del solvente o fase móvil aumenta con la polaridad. Sin embargo, cuando la fase estacionaria es no polar, como el polidivinilbenceno (por ejemplo, XAD-2), la fuerza del solvente disminuye al aumentar la polaridad de la fase móvil. La fuerza de un solvente está directamente relacionada con su polaridad.

La polaridad del solvente se ha descrito y cuantificado de diversas maneras.^{ref(176)} Los cuatro esquemas más comunes de clasificación de la polaridad de los solventes son (1) el parámetro de solubilidad Hildebrand, que se basa en las propiedades termodinámicas del compuesto en cuestión;^{ref(177)} (2) la escala de polaridad Rohrschneider de valores P' , que se



basa en la medición de las propiedades de los solventes mediante el uso de solutos modelos; [ref\(178\)](#) (3) la serie eluotrópica, que clasifica los solventes en orden de su poder de elución para remover los solutos de una fase estacionaria polar, como la alúmina; [ref\(179\)](#) y (4) la agrupación de selectividad de solventes de Snyder y Karger, que es una mezcla de los tres enfoques anteriores e incorpora parámetros específicos de solubilidad para las interacciones de dispersión, dipolares, y puentes de hidrógeno. En la Tabla 5-2 se muestra una lista de los grupos de selectividad de solventes, junto con clases representativas de compuestos y ejemplos específicos para cada grupo.

Los solventes dentro de un grupo presentan los mismos tipos de fuerzas de atracción. Por ejemplo, los compuestos del grupo 1 (I) son todos los aceptores fuertes de puentes de hidrógeno y los donantes débiles de puentes de hidrógeno, y tienen momentos dipolares intermedios. Los solventes en grupo 5 (V), son los compuestos cuyas interacciones dipolares predominan sobre cualquier interacción de puentes de hidrógeno. Sin embargo, los solventes en el grupo 0 son compuestos en que la fuerza predominante son las interacciones de dispersión (o sea, dipolos temporales). Estos solventes no tienen dipolos permanentes, ni interactúan a través de puentes de hidrógeno.

El grado global de las fuerzas de interacción del solvente se cuantifica con el índice de polaridad, P' . [refs\(180\)](#) En la Tabla 5-3 se presenta una lista de los solventes más comúnmente usados en cromatografía, con los valores para sus índices de polaridad y sus clasificaciones como grupos de selectividad de solventes. Hay que notar que los solventes dentro de cualquier grupo pueden variar ampliamente en su grado global de polaridad. Por ejemplo, los solventes enumerados en el grupo 6 (VIA) varían en más de tres unidades de polaridad. En el grupo 2 (II), el índice de polaridad varía en más de dos unidades. Aunque estas variaciones sean relativamente grandes, uno debe recordar que los solventes dentro del mismo grupo presentan las mismas clases de interacciones químicas.

Esta información puede usarse como la base para la selección de solventes y puede usarse para variar la selectividad de la fase móvil, \propto , a fin de mejorar la resolución. El primer paso importante en la selección del solvente es maximizar la solubilidad del soluto en un solvente dado. Para que un solvente sea una fase móvil efectiva en cromatografía, debe disolver la muestra sobre el rango esperado de concentraciones del soluto.

El factor más importante que afecta la solubilidad del soluto es la polaridad del solvente. Uno puede variar la polaridad de la fase móvil líquida sistemáticamente, sobre un amplio rango de valores de P' , usando una combinación de dos solventes, ya que las polaridades de los solventes son aditivas de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$P' \text{ (de los solventes combinados A + B)} = \phi_A P'_A + \phi_B P'_B \quad \text{Ec. 5-11}$$

En esta expresión, ϕ_A y ϕ_B son las fracciones de volumen de los solventes A y B, que tienen polaridades de solvente de P'_A y P'_B , respectivamente. Los dos solventes deben diferir en los valores de P' para que se pueda alcanzar la máxima solubilidad de la muestra. Es importante que los dos solventes sean miscibles en todas las proporciones. Generalmente, un solvente que es demasiado débil (A) para disolver la muestra, se mezcla con un solvente que es demasiado fuerte (B). Los dos solventes, se eligen ahora de los grupos de solventes (Tabla 5-3) según la compatibilidad de las fuerzas de interacción con los solutos de la muestra y las



características químicas que determinan la funcionalidad de la fase estacionaria. Por ejemplo, para calcular P' para la mezcla de solventes de isooctano (solvente A) y cloroformo (solvente B), sus valores individuales de polaridad se obtienen de la Tabla 5-3. Cualquier mezcla de estos dos solventes variará en polaridad desde -0.4 a 4.3, o sea, del más débil (100% de isooctano) al más fuerte (100% de cloroformo). Una mezcla de 50%:50% de estos dos solventes tendría una P' de $(0.5 \times -0.4) + (0.5 \times 4.3)$ ó 1.95. Además, para cada cambio del 10% en la composición del solvente, la polaridad de la mezcla cambiará en 0.47 unidades:

$$0.1(P'_B - P'_A) = 0.1 (4.3 - [-0.4]) = 0.47$$

Una vez una que se ha encontrado una mezcla adecuada de solventes que disuelva la muestra, se aplica luego a un sistema cromatográfico como una columna de sílica para HPLC. Como se discutió anteriormente, el índice de retención k' para los solutos en la muestra, se maximiza a un valor de entre 2 y 8. Esto se realiza mediante el ajuste de la polaridad del solvente por los cambios pequeños en las proporciones relativas de los dos solventes.

La resolución, luego se maximiza para la separación del soluto mediante ajustes en la selectividad cromatográfica α . Esto se hace al intercambiar uno de los solventes de la fase móvil por un solvente de otro grupo de selectividad de solventes (ver Tabla 5-3), pero manteniendo la *misma polaridad* de la mezcla global. Por ejemplo, el cloroformo, $P' = 4.3$, podría intercambiarse con isopropanol, $P' = 4.3$, en la mezcla de cloroformo isooctano anteriormente descrita. El efecto neto de este intercambio, sería ir de un solvente que es un donador fuerte de puentes de hidrógeno, el cloroformo, a un solvente que es al mismo tiempo un donador y un aceptor fuerte de puentes de hidrógeno. Otros ejemplos de tales cambios se dieron antes en la discusión sobre la selectividad. Discusiones adicionales de la selección y optimización del solvente las dan Snyder y colaboradores. [refs\(181\)](#)

En principio, este enfoque es una guía general para la elección del solvente tanto para la disolución de la muestra como para optimizar una fase móvil en LC (HPLC, cromatografía de capa fina, etc.). Sin embargo, se requiere el conocimiento de las fuerzas que participan en el proceso de separación cromatográfica. Esto último se trata en las siguientes secciones, sobre el papel de la polaridad de la fase estacionaria y los mecanismos de la cromatografía.

Polaridad y selectividad de la fase estacionaria

La fase estacionaria es el componente fundamental de la separación cromatográfica (Tabla 5-4). La función de la fase estacionaria depende de su selectividad, que a su vez, es determinada por la polaridad de la fase. Las fuerzas que constituyen la polaridad de la fase estacionaria son las mismas interacciones responsables de la polaridad de la fase móvil (solvente): las fuerzas de dispersión, dipolares, los puentes de hidrógeno y dieléctricas.

La fuerza relativa de la polaridad de las fases estacionarias es más difícil de evaluar que la fuerza relativa de la polaridad de las fases móviles líquidas, como se describió anteriormente. La mayoría de la atención se ha dirigido a las fases estacionarias usadas en GC, en que las dos variables principales que determinan la separación son la fase estacionaria misma y la temperatura de la columna. En esta forma de cromatografía, los estudios de afinidad de las moléculas de soluto de polaridades variables, han conducido a un sistema de clasificación para la fase estacionaria de acuerdo a la polaridad. Los detalles en las clasificaciones de Rohrschneider [ref\(182\)](#) y McReynolds [ref\(183\)](#) pueden encontrarse en el Capítulo



7.

Mecanismos de Cromatografía

Los mecanismos por los cuales un método cromatográfico puede separar los componentes de la muestra, se basan en general en las interacciones polares y las interacciones físicas (interacciones resultantes del tamaño y forma de las moléculas del soluto). Esta última interacción es principalmente el mecanismo de la cromatografía de penetración de gel, aunque el tamaño molecular juega un papel menor en otras modalidades de la cromatografía. Las otras clases mecanicistas de cromatografía son la adsorción, partición, y el intercambio iónico. Cada uno se trata brevemente en las siguientes secciones.

Adsorción

Las interacciones de las moléculas del soluto o de la fase móvil en la superficie de una partícula sólida, forman la base del mecanismo de adsorción. Hay fundamentalmente dos tipos de adsorbentes; no polares y polares. La última categoría incluye aquellos que son ácidos (o sea, tienen superficies que aceptan electrones) y aquellos que son básicos (o sea, tienen superficies que donan electrones).

Los adsorbentes no polares tienen una aplicación limitada en la cromatografía de gas-sólido (“gas solid chromatography” o “GSC”, en inglés)[ref\(184\)](#) (ver Capítulo 7). El mecanismo de adsorción del soluto a las fases estacionarias no polares, es principalmente a través de las interacciones dispersivas. La retención es determinada por la energía de adsorción y el volumen superficial de la fase estacionaria. Una disminución en la temperatura o un aumento de la presión incrementa la adsorción. Lo inverso es también cierto; o sea un aumento en la capacidad para remover el soluto de una fase estacionaria o “desorción”, puede realizarse mediante un aumento de la temperatura o una disminución en la presión.

Los adsorbentes polares son las fases estacionarias más ampliamente usadas en la cromatografía sólido-líquido (LSC), con aplicaciones tanto en los métodos planos como de columna. Las aplicaciones en GSC están limitadas. Las fases estacionarias más comunes son la sílica y la alúmina para LSC, y sílica o vidrio poroso y aluminosilicatos (zeolitas o tamizes moleculares) para GSC. Este último grupo también tiene aplicaciones en LC para la cromatografía de penetración de gel, en la cual la separación es principalmente a través del mecanismo de exclusión molecular. Esto se trata posteriormente en la sección sobre el mecanismo de penetración de gel.

Los principales adsorbentes polares usados en LC son la sílica y la alúmina, que representan más de 95% de las aplicaciones en HPLC[ref\(185\)](#) y la cromatografía de capa fina (TLC).[refs\(186\)](#) Tanto los puentes de hidrógeno como las interacciones dipolares entre el soluto y los grupos hidroxilo superficiales (sílica y alúmina lavada con ácido) o el oxígeno aniónico (alúmina lavada con base) de las fases estacionarias, constituyen los mecanismos de separación por este método (Fig. 5-12). El número y arreglo topográfico de estos grupos, junto con el área superficial total, determinan la actividad y la fuerza de la adsorción. La retención de los solutos en estas fases aumenta al aumentar la polaridad de la clase del compuesto (Tabla 5-5). La retención de una molécula del soluto requiere el desplazamiento de moléculas del solvente adsorbidas (Fig. 5-13). Los ajustes en la polaridad solvente, como se describió anteriormente,



determinan en última instancia la fuerza de adsorción del soluto a la fase estacionaria y las características de retención del sistema.

La cromatografía de adsorción ofrece muchas ventajas para su uso en las separaciones de LC. Primero, está disponible una bibliografía extensa al investigador para la separación de muchos tipos y clases de compuestos por TLC. Estos métodos se pueden transferir fácilmente a la HPLC de adsorción. Segundo, la flexibilidad, velocidad, y bajo costo de la TLC permiten su uso en el desarrollo experimental, en particular para la selección de las fases móviles. Una vez que se ha logrado la separación óptima, la transferencia del método a HPLC es directa. Tercero, la TLC tiene un gran valor para uso en la investigación preliminar de muestras con constituyentes desconocidos, en particular cuando uno considera las ventajas señaladas anteriormente. Finalmente, la cromatografía de adsorción, en particular con sílica gel, se ha usado ampliamente para la separación de medicamentos, tanto en la modalidades de HPLC como de TLC.

Partición

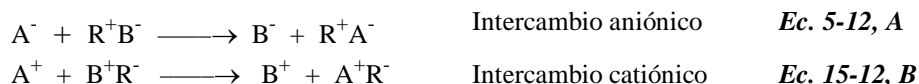
La cromatografía de partición se basa en la separación de los solutos mediante el uso de las diferencias de su distribución entre dos fases inmiscibles. En cromatografía líquido-líquido (LLC), el soporte de la fase se recubre generalmente con una sustancia polar (fase normal), y se obtienen las separaciones utilizando una fase móvil inmiscible. Un sistema de partición de fase normal consistiría de sílica recubierta con una monocapa de agua o algún otro líquido polar y un sistema de solventes relativamente no polar. Las separaciones en este sistema se basan en la polaridad del soluto, donde los compuestos menos polares eluyen primero y las sustancias más polares son retenidas más tiempo (Fig. 5-14). Un sistema semejante de separación opera en la cromatografía en papel, en la cual la celulosa está recubierta con una monocapa acuosa, y los solventes inmiscibles se usan como la fase móvil.

En 1969, Halasz y Sebastian^{ref(187)} introdujeron una variación en la fase estacionaria para LLC, en la cual el soporte de sílica se modificó químicamente para producir una monocapa de un sustituyente orgánico no polar. Estos soportes de fase estacionaria químicamente unidos, están disponibles con una variedad de grupos funcionales. Las fases de este tipo más comúnmente usadas, son las fases de hidrocarburo como el octadecil o los grupos octilo unidos a la sílica (Fig. 5-15). La naturaleza orgánica de las fases unidas imparte un carácter no polar a la fase estacionaria. Por consiguiente, las fases móviles comúnmente usadas son sumamente polares, como el agua, metanol, o acetonitrilo (ver Tabla 5-3). Los solutos son separados por su carácter relativamente no polar (o sea, el más polar eluye primero), mientras que los solutos no polares se retienen más tiempo. Considerando este tipo de características de separación, el uso de las fases químicamente unidas en la LLC se denomina cromatografía de fase inversa. En el Capítulo 6 se presenta una discusión adicional y ejemplos de LC de fase normal y de fase inversa.

Otro ejemplo de cromatografía en la cual funciona un mecanismo de partición, es la cromatografía de gas-líquido (GLC). Las fuerzas de la interacción entre las moléculas del soluto y la fase estacionaria recubierta por líquido, son las mencionadas anteriormente para LLC. Sin embargo, para GC, la fase móvil actúa como un portador inerte de los constituyentes de la muestra, mientras que en la LLC la fase móvil es un componente activo, interactuando en el mecanismo de partición.

Intercambio de iones

La cromatografía de intercambio iónico usa fases estacionarias que tienen cargas formales positivas o negativas. El mecanismo de retención más común es el intercambio de los iones de la muestra, *A*, y los iones de fase móvil, *B*, con los grupos cargados, *R*, de la fase estacionaria:



En el primer caso, está ocurriendo un intercambio de aniones, mientras que el intercambio de cationes se muestra en el segundo; los iones de la muestra compiten con iones de la fase móvil por los sitios iónicos en la fase estacionaria. Los iones de la muestra que interactúan débilmente con la fase estacionaria se retendrán menos, mientras que aquellos que interactúan fuertemente se retendrán más y se eluirán posteriormente. La principal fuerza de estas interacciones es electrostática, o atracción de cargas opuestas.

Para efectuar una separación de los constituyentes de la muestra, se controla el grado de ionización de las moléculas de la muestra mediante variaciones en el pH de la fase móvil. Ya que los solutos son predominantemente los ácidos débiles, HA, o las bases, B, un cambio en el pH desplazará los siguiente equilibrios de ionización a la derecha o a la izquierda:



Un aumento en la ionización conduce a una mayor retención de la muestra. Los factores diferentes del pH que controlan la retención del soluto en la cromatografía de intercambio iónico son (1) la fuerza de la carga del ion del soluto, (2) la fuerza iónica de la fase móvil, y (3) la fuerza de la carga del contraión en la fase estacionaria. Uno puede disminuir el retardo de los solutos al aumentar la fuerza iónica de la fase móvil y reducir la fuerza del contraión, por ejemplo, mediante el uso de Na⁺ en vez de H⁺ para las fases de intercambio catiónico, o al ajustar el pH de la fase móvil a fin de reducir la disociación ya sea del soluto, el contraión en el empaque, o ambos.

Cromatografía de penetración en gel⁴³ (exclusión molecular o por tamaño)

En contraste a los mecanismos anteriores y modalidades de cromatografía, la separación por cromatografía de penetración de gel (GPC) se basa estrictamente en el tamaño molecular. La fase estacionaria de la GPC contiene poros de un tamaño promedio determinado, y si las moléculas de la muestra son demasiado grandes para entrar en los poros, éstas no se retienen (son excluidas) por la fase estacionaria y se eluyen al principio en la columna. Las moléculas pequeñas de la muestra se embeben fuertemente en los poros y se retienen por más tiempo. Finalmente, estas moléculas difunden de los poros y son

transportadas por el flujo de la fase móvil. Las moléculas de la muestra de tamaño intermedio entran en los poros hasta cierto punto, pero no se retienen tan fácilmente como las moléculas pequeñas porque no penetran tan profundamente en los poros. Éstas, se eluyen de la columna con volúmenes que varían entre los que necesitan para eluir los solutos más grandes (V_e grande) y los solutos más pequeños (V_e pequeño). Este mecanismo se ilustra en la Fig. 5-16.

La ventaja principal de esta modalidad de cromatografía es que el método de LC puede usarse para separar prácticamente cualquier muestra, mientras sea soluble en una fase móvil. Además, es aplicable a las especies solubles con un peso molecular promedio desde 50 hasta más de 10 millones. Ya que el tamaño molecular es la propiedad de interés, se deben obtener curvas de calibración representativas mediante el uso de estándares de calibración de peso molecular conocido. Asimismo, la elección de fases estacionarias se basa en el rango esperado de peso molecular de las moléculas del soluto en la muestra y la compatibilidad con la fase móvil. Una fase móvil para GPC, debe elegirse primero sobre la base de la solubilidad de la muestra, y luego se selecciona una fase estacionaria compatible. La mayoría de las fases estacionarias son compatibles con los solventes acuosos donadores de protones (como el metanol). Sin embargo, hay fases estacionarias que son compatibles sólo con solventes orgánicos. Las listas de las fases disponibles para GPC están clasificadas en tablas en la información de los fabricantes, en las revisiones bibliográficas, [ref\(188\)](#) y en los libros.

Preparación de Muestra para Cromatografía

Naturaleza del problema

Pocos análisis cromatográficos se realizan en la forma en que la muestra se recibe en el laboratorio clínico. Para cualquier muestra dada, la meta del análisis cromatográfico es conseguir una determinación cualitativa o cuantitativa de sus componentes. Para lograr este objetivo, uno debe separar los componentes de interés como zonas discretas con las mismas distribuciones de picos o manchas y valores de k' y R_f , que tienen los estándares en condiciones cromatográficas idénticas. Sin embargo, la complejidad de una matriz de una muestra biológica, generalmente hace que la separación cromatográfica sea ineficaz debido a (1) la interacción de las impurezas de la muestra con la fase estacionaria, causando una reducción del poder de resolución del sistema; (2) la saturación de la mayoría de los sistemas de detectores cromatográficos, que tiende a elevar el nivel de ruido, y por consiguiente disminuye la sensibilidad; (3) la interacción del componente de interés con otros componentes de la matriz, conduciendo a falta de reproducibilidad en la separación de muestra a muestra; y (4) componentes mal resueltos que dificultan el análisis. Para reducir al mínimo estos efectos de la muestra en la separación cromatográfica, se requiere una estrategia para la separación del compuesto analizado de los componentes interferentes (*limpieza de la muestra*).

Cualquier método de separación empleado en el laboratorio debe satisfacer los criterios del rendimiento, separación, capacidad y efectividad en función de los costos. Las ventajas de tener un alto rendimiento en cualquier paso de manipulación de la muestra son obvias, pero si la recuperación es cuantitativa con poca purificación, el método es insatisfactorio. El corolario es también cierto: si la separación de las impurezas es excelente pero hay un rendimiento bajo, el método tiene poco valor. Muchos métodos de separación se



aplican fácilmente en gran escala, cuando se dispone de grandes cantidades de muestra, pero otros son aplicables sólo a las separaciones en pequeña escala. El criterio de efectividad en función de los costos, que incluye tiempo, equipo, reactivos y mano de obra, puede conducir a una situación en que el uso de un método de separación no sea práctico.

La estrategia de preparación de la muestra para el análisis cromatográfico debe considerar sí el objetivo del análisis es detectar cuantitativamente o cualitativamente la sustancia de interés.[ref\(189\)](#)

Métodos mecánicos para el aislamiento inicial del compuesto analizado

El tipo de muestra recibida por el analista en un laboratorio clínico de química varía desde un líquido sencillo que parece homogéneo como el sudor, hasta un sólido heterogéneo complejo como las heces. Sin embargo, las matrices de muestra que se reciben más comúnmente son la orina y la sangre (o plasma). El paso inicial en la preparación del compuesto analizado para cromatografía variará según la matriz.

Las muestras sólidas, como los tejidos o las heces, primero se disocian o se tratan para preparar una solución o suspensión homogénea de la cual se puede aislar el compuesto analizado. La homogeneización de los tejidos en una licuadora, como un Polytron (Brinkmann Instruments Inc., Westbury, N.Y.) con un solvente apropiado, puede solubilizar el compuesto analizado deseado. También resulta eficaz el uso de un triturador tisular Potters-Elvehjem. El tejido también puede extraerse en un mortero con un mazo y una cantidad pequeña de solvente. Además de estas técnicas para triturar o romper, las muestras sólidas pueden ser disociadas por “sonicación” (ruptura usando ultrasonido) en el solvente o hidrolizarse con ácidos, bases, o enzimas. Se ha desarrollado un procedimiento para preparar polvos homogéneos de las heces y su extracción posterior, para la investigación del metabolismo de medicamentos.

Incluye la trituración de la muestra con un molino de balines de acero inoxidable en presencia de sulfato de sodio anhidro.[ref\(190\)](#)

Las muestras líquidas también pueden requerir un tratamiento inicial para extraer los compuestos analizados, secuestrados por los componentes de la matriz. Se ha usado la hidrólisis básica moderada para liberar los bifenilos policlorados secuestrados, de los componentes lipídicos sanguíneos.[ref\(191\)](#) La sangre entera puede diluirse con agua estéril para romper las células sanguíneas osmóticamente antes del aislamiento de compuesto analizado. Existe otro tratamiento inicial aplicado a las muestras de sangre u orina, para remover las proteínas y otras macromoléculas mediante la precipitación. Dos de los agentes que se usan más comúnmente para precipitar proteínas son el ácido tricloroacético y el sulfato de bario.

En otros métodos mecánicos de disociación de matrices, como la homogeneización en un solvente o amortiguador, se emplea comúnmente la centrifugación para remover los restos celulares, material particulado, u otros contaminantes grandes. Un método alternativo para la remoción del material insoluble es la filtración, o a través de un material inerte, como la lana de vidrio, o a través de una membrana de nitrocelulosa o de nilón.

Métodos cromatográficos para el aislamiento inicial del compuesto analizado

Un método común para el aislamiento inicial de los componentes de interés de las soluciones acuosas, como la orina o sangre, es el uso de la resina de cromatografía



XAD-2.[ref\(192\)](#) Esta fase estacionaria de polydivinlbenceno tiene un área superficial grande y es de carácter no iónico, lo cual la hace capaz de adsorber muchas clases de compuestos orgánicos en solución acuosa, principalmente debido a interacciones dispersivas y dipolares. Las sustancias orgánicas adsorbidas se eluyen de XAD-2 usando solventes orgánicos como el metanol, acetona, éter dietílico, hexano, cloruro de metileno, o combinaciones de estos solventes.[ref\(193\)](#) La separación con XAD-2 se ha aplicado con mayor frecuencia en la orina o en los métodos de tamizaje de sangre para drogas de abuso y sus metabolitos, pero también puede aplicarse para aislar cantidades traza de varios tipos de compuestos.

Otra técnica cromatográfica muy común para el aislamiento inicial del compuesto analizado, es el uso de pequeñas columnas de sílica o de fase unida a octadecilsilil.[refs\(194\)](#) Los compuestos analizados de un volumen relativamente grande de muestra, son adsorbidos de la solución acuosa por fuerza similares a aquellas que operan en el procedimiento de XAD-2. La desorción se realiza cuando un volumen pequeño de un solvente adecuado, se pasa a través de la sílica o el cartucho de fase inversa; la muestra luego puede procesarse por cualquier tipo de cromatografía. Muchas resinas adicionales, del tipo recién descrito, están disponibles actualmente para el aislamiento de los compuestos de interés del químico clínico.[ref\(195\)](#)

Otros tipos de métodos cromatográficos se han usado en la preparación de las muestras para el análisis. La cromatografía de intercambio iónico se ha usado ampliamente para aislar compuestos analizado cargados. El intercambio de aniones, sugerido primero por Horning y Horning,[ref\(196\)](#) ha sido ampliamente usado para el aislamiento de los constituyentes ácidos de fluidos biológicos. Aunque el DEAE-Sephadex es la fase estacionaria de intercambio iónico más ampliamente usada para la limpieza de muestras, también se han usado otros intercambiadores aniónicos como el AGIX y Dowex 3.

Métodos de extracción para el aislamiento del compuesto analizado

Los métodos de partición líquido-líquido y sólido-líquido se han usado ampliamente para los pasos de extracción primarios y secundarios, en una amplia variedad de análisis de química clínica antes del paso de cuantificación cromatográfica. Las razones para el uso de los procedimientos de extracción son numerosas, incluido el aislamiento del compuesto analizado a partir cantidades grandes de materiales contaminantes, y su concentración en un volumen pequeño de solvente, haciendo más fácil la detección. Los procedimientos de extracción líquido-líquido se realizan fácilmente, permitiendo generalmente el examen de las muestras múltiples simultáneamente.

El éxito de un paso de extracción depende del conocimiento de la polaridad del compuesto analizado. Esta información se usa para seleccionar un solvente, que extraerá eficazmente el compuesto analizado de la muestra. Una regla general para la selección del solvente, es que los compuestos tienden a favorecer los solventes que tienen las mismas fuerzas interactivas de polaridad. Es crítico que el solvente elegido sea inmiscible con la matriz de la muestra.

Hay otros puntos por considerar en la selección del solvente. El solvente debe ser químicamente compatible con el compuesto analizado; o sea, no deben reaccionar químicamente entre los dos. El solvente debe ser compatible con todas las operaciones posteriores después de la extracción. Por ejemplo, un solvente con un punto de ebullición elevado sería difícil de remover, ya que sería difícil concentrar la solución del compuesto analizado por evaporación. El solvente no debe introducir ningún contaminante que dificulte

el análisis. Muchas empresas de suministro de laboratorio ofrecen solventes comunes con altos grados de pureza, como (1) Los *solventes de grado HPLC*, que son compatibles con la mayoría de los sistemas de detectores y no contienen material particulado que dañe el equipo de HPLC; (2) los *solventes de grado plaguicida*, que son compatibles con detectores de captura de electrones para GC porque no introducen ninguna sustancia contaminante; y (3) los *solventes de grado lipogrado*, que no contienen ninguna grasa u otras sustancias que interferirían con el análisis de lípidos. Estos son sólo unos pocos tipos de solventes de calidad disponibles. Si el solvente no está disponible en la pureza necesaria, debe hacerse una purificación del solvente antes de usar cualquier procedimiento de limpieza de muestras. Generalmente, bastará una destilación del solvente, pero a veces se requieren medidas de purificación más extensas. Los métodos de procedimientos de purificación más rigurosos para la mayoría de los solventes se describen en el texto de Weissberger.[ref\(197\)](#) Aún con el uso de los solventes de la más alta calidad comercialmente disponibles o con purificación previa, las impurezas todavía pueden ser un problema. El tipo de contaminante más común son los plastificantes, que generalmente provienen de los forros de las tapas de contenedores, y otros materiales plásticos.[ref\(198\)](#) Estos contaminantes, diversos ftalatos de alquilo, pueden interferir en algunos análisis, en particular cuando se usan en cromatografía de gases con captura de electrones. Se ha demostrado que las tapas de rosca recubiertas con un forro de los tubos de extracción o los viales de muestras, son la fuente de contaminantes que interfieren con la GC.[ref\(199\)](#) Estos problemas de contaminación pueden eliminarse al usar los forros de las tapas de rosca hechos de Teflon.

Una vez que se ha tomado una decisión sobre los solventes para la extracción, se deben considerar las condiciones reales que implica este paso. En general, será más eficiente una serie repetida de extracciones con volúmenes pequeños de solvente, que una sola extracción con un volumen grande. Para las muestras sólidas, el solvente puede introducirse durante el paso de ruptura mecánica, como se mencionó anteriormente. El ciclo de trituración, sonication, o el método particular empleado se repite varias veces con varios volúmenes del solvente. Sin embargo, haciendo esto a veces no se extrae eficazmente el compuesto analizado deseado. En este caso, puede ser necesario extraer la muestra sólida pulverizada con un aparato de extracción Soxhlet o con un dispositivo de infusión continua. Ambos métodos son más eficientes que las operaciones manuales para la extracción de las sustancias de una matriz sólida. Sin embargo, los requerimientos para estos métodos incluyen el uso de un solvente para la extracción razonablemente volátil y que el compuesto analizado sea estable en el punto de ebullición de dicho solvente.

Para extraer un compuesto analizado con grupos ionizables, es mejor solubilizar primero la muestra sólida en una solución acuosa. Luego se ajusta el pH de la solución de la muestra debajo del pK_a de los componentes ácidos o encima del pK_a de los componentes básicos, mediante la adición de un ácido o una base, respectivamente. Esta operación se realiza para convertir el compuesto analizado, 95% o más, a la forma en que se puede extraer más fácilmente (no ionizada). Hopgood,[ref\(200\)](#) construyó un nomograma que relaciona los valores de pK con el porcentaje de ionización a diferentes valores de pH. Si el pK_a del compuesto analizado se desconoce, generalmente basta con reducir del pH de la solución acuosa a un valor de 2.0, mediante la adición de ácido para permitir la extracción de la mayoría de los compuestos analizado ácidos. Asimismo, normalmente es suficiente elevar el



pH a 12 para permitir la extracción de la mayoría de los compuestos analizados básicos de pK_a desconocido.

Para la extracción líquido-líquido, un aumento de la fuerza iónica de la fase acuosa hará más fácil la extracción del compuesto analizado, ya que este procedimiento favorecerá la extracción del solvente. Comúnmente se usa una sal neutral iónica, como el cloruro de sodio o el bromuro de potasio, con esta finalidad.

Uno de los problemas que se encuentran con frecuencia en las extracciones líquido-líquido, es la formación de emulsiones, o sea una de las fases inmiscibles viene a ser dispersada como gotitas finas en la otra. Para evitar la formación de emulsiones, pueden tomarse varias precauciones durante el proceso de extracción real: (1) Si las dos capas líquidas tienen una superficie grande de contacto, evite la mezcla vigorosa de las fases. Una extracción adecuada se puede lograr con agitación suave. (2) Filtre todas las partículas finamente divididas antes de la extracción. (3) Use pares de solventes con diferencias grandes de densidad.

Sí se forma una emulsión, existen varios procedimientos que pueden romperla. Primero, trate de lograr la coalescencia de las gotitas dispersas mediante la disociación mecánica de sus superficies. A veces se romperá la emulsión agitando con una varilla de vidrio o por filtración a través una cama floja de lana de vidrio. Segundo, si las densidades de los dos solventes son suficientemente diferentes, se puede alcanzar la separación por centrifugación. Tercero, el enfriamiento o la congelación de la mezcla a veces causa la coalescencia de la gotitas dispersas. Cuarto, un aumento de la fuerza iónica, mediante la adición de sal o una cantidad pequeña de un alcohol, como el etanol o el 2-etil-1-hexanol, puede causar una disminución en las fuerzas que estabilizan la emulsión. Quinto, se puede romper la emulsión realizando un cambio en la proporción de las dos fases, mediante la adición de más solvente de extracción o una evaporación parcial del solvente. Finalmente, la filtración mediante el papel filtro de separación de fases romperá muchas emulsiones que se presentan comúnmente.

En la mayoría de los casos, uno de estos procedimientos tendrá éxito para romper la emulsión. Para ejemplos del uso de las técnicas de extracción de solventes, vea los procedimientos para el análisis de los medicamentos en el Capítulo 51.

Procesamiento de los extractos de la muestra

Muchos extractos del compuesto analizado son demasiado diluidos para el análisis cromatográfico directo o para las reacciones de obtención de derivados antes de la cromatografía, y generalmente se concentran mediante la evaporación del solvente de extracción.

Cualquier procedimiento de evaporación del solvente debe conducirse con cuidado para evitar pérdidas del compuesto analizado. Tal pérdida puede ocurrir si hay trazas de agua en el extracto. El agua puede eliminarse mediante el uso de una sal anhidra, como el carbonato de sodio o el sulfato de sodio. También pueden usarse otras sales deshidratantes, como el óxido de calcio o el sulfato de magnesio. El proceso de secado del extracto también puede tener como propósito conducir posteriormente un procedimiento de obtención de derivados, como la acetilación o la siliconización, o para prevenir interferencias en el paso de la cromatografía.

Durante la concentración de un extracto, uno debe tener cuidado de evitar pérdidas del compuesto analizado. Éste se puede perder al unirse irreversiblemente a las paredes del vaso utilizado durante la concentración. Esto puede evitarse mediante la siliconización previa de la cristalería. Algunas sustancias (que pueden ser el compuesto de interés) son suficientemente volátiles para formar mezclas azeotrópicas con el solvente y se pueden perder durante la evaporación. Para evitar esto, están disponibles muchos métodos o aparatos de concentración suave. Los concentradores MicroSynder o Kurderna-Danish, evaporan el solvente en condiciones leves. Si el compuesto analizado es sensible al calor o al oxígeno, puede emplearse la evaporación del solvente bajo una corriente de un gas inerte purificado, como el nitrógeno o el argón. En este caso, uno puede calentar el vaso a una temperatura de 35 a 50 °C para acelerar el proceso de evaporación. El uso de un evaporador rotatorio bajo presión reducida es también un método suave para la evaporación del solvente. Alguacil y cols.[ref\(201\)](#) han hecho una comparación de los métodos de reducción del solvente en que las recuperaciones de los compuestos analizados variaron desde un 41% a un 140%, dependiendo del método empleado. Estos resultados recalcan la importancia de la validación de los métodos y el papel clave que juega el aseguramiento de la calidad de los análisis, como la fortificación de muestras con el compuesto analizado, en la implementación de la estrategia para la limpieza de la muestra.

Otro método para concentrar el compuesto analizado es la reextracción del compuesto de interés del solvente. Por ejemplo, Kossa y asociados[ref\(202\)](#) han publicado una variedad de métodos mediante los cuales el compuesto analizado, en el solvente original, se vuelve a extraer en un volumen pequeño del solvente que se usará para derivatizar el compuesto antes de someterlo a la cromatografía de gases. Los métodos de este tipo aceleran el análisis, ya que no se requieren pasos de evaporación del solvente. Otros ejemplos de los procedimientos de limpieza del compuesto analizado para la preparación de muestras de cromatografía, se detallan en la revisión de Ko y Petzold[ref\(203\)](#) y Sunshine.[ref\(204\)](#) Ejemplos adicionales se dan en los capítulos 6 y 7 referentes a HPLC y GC.

Referencias

1. Anderson DJ, Van Lente F, Apple FS, et al: Clinical chemistry, *Anal Chem* 63:165R-270R, 1991.
2. Eiceman GA, Clement RE, Hill HH Jr: Gas chromatography, *Anal Chem* 64:170R-180R, 1992.
3. Dorsey JG, Foley JB, Cooper WWT, et al: Liquid chromatography: theory and methodology, *Anal Chem* 64:353R-389R, 1992.
4. Sherma J: Planar chromatography, *Anal Chem* 64:134R-147R, 1992.
5. Tswett MS: Chromatographic absorption analysis: selected works. In Berezken VG, compiler; Masson MR, translation editor: Ellis *Horwood Series in Analytical Chemistry*, New York, 1990, E. Horwood Publishing.
6. Heftman E: History of chromatography. In Heftman E, editor: Chromatography: fundamentals and applications of chromatography and related differential migration methods, ed 5, *Journal of Chromatography Library*, vol 51Aa, New York, 1992, Elsevier Science Publishers.
7. Strain HH, Svec WA: Differential methods of analysis. In Heftman E, editor: *Chromatography: a laboratory handbook of chromatography methods*, ed 3, New York, 1975, Van Nostrand Reinhold Co.
8. Kalasz H, Ettre LS: *Chromatography: the state of the art*, Wellingborough, U.K., 1984, Collets.
9. Ettre LS: The development of chromatography, *Anal Chem* 43:20A-21A, 25A, 27A-31A, 1971.
10. Laitinen HA, Ewing GW, editors: *A history of analytical chemistry*, Washington, D.C., 1977, Analytical Chemistry Division of American Chemical Society.



11. Giddings JC: Reduced plate height equation: a common link between chromatographic methods, *J Chromatogr* 13:301-304, 1964.
12. Schoenmakers OJ: *Optimization of chromatographic selectivity: a guide to method development*, New York, 1986, Elsevier.
13. Wong HY: *Therapeutic drug monitoring and toxicology, Chromatographic Science Series*, vol 32, New York, 1985, Marcel Dekker.
14. Snyder LR, Glajch JL, Kirkland JJ: *Practical HPLC method development*, New York, 1988, Wiley & Sons.
15. Sherma J, Fried B, editors: *Thin layer chromatography, Chromatographic Science Series*, vol 55, New York, 1990, Marcel Dekker.
16. Snyder LR: A rapid approach to selecting the best experimental conditions for high speed liquid column chromatography. 1. Estimating initial sample resolution and the final resolution required by a given problem, *J Chromatogr Sci* 10:200-212, 1972.
17. Katz E: *Quantitative analysis using chromatographic techniques*, New York, 1987, Wiley & Sons.
18. Giddings JC: Non-equilibrium and diffusion: a common basis for theories of chromatography, *J Chromatogr* 2:44-52, 1959.
19. Snyder LR, Kirkland JJ: *Introduction of modern liquid chromatography*, ed 2, New York, 1979, Wiley & Sons.
20. Martin AJP, Synge RLM: A new form of chromatogram employing two liquid phases. I. A theory of chromatography. II. Application to the micro-determinations of the higher monoaminoacids in proteins, *Biochem J* 35:1358-1368, 1941.
21. Van Deemter JJ, Zuiderweg FJ, Klinkenberg A: Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography, *Chem Engl Sci* 5:271-289, 1956.
22. Grob RL: *Modern practice of gas chromatography*, ed 2, New York, 1985, Wiley & Sons.
23. Rotzsche H: Stationary phases in gas chromatography, *Journal of Chromatography Library*, vol 48, New York, 1991, Elsevier Science Publishers.
24. Knapp DR: *Handbook of analytical derivatization reactions*, New York, 1979, Wiley & Sons.
25. McMahon DH: Methods development guidelines for chemical derivatization in gas chromatography, *J Chromatogr Sci* 23:426-428, 1985.
26. Lawrence JF: Advantages and limitations of chemical derivatization for trace analysis by liquid chromatography, *J Chromatogr Sci* 23:484-487, 1985.
27. Lingeman H, Underberg WJM, editors: *Detection-oriented derivatization techniques in liquid chromatography, Chromatographic Science Series*, vol 48, New York, 1990, Marcel Dekker.
28. West SD: The prediction of reversed-phase HPLC retention indices and resolution as a function of solvent strength and selectivity, *J Chromatogr Sci* 25:122-129, 1987.
29. Keller RA, Snyder LR: Relation between the solubility parameter and the liquid-solid solvent strength parameter, *J Chromatogr Sci* 9:345-459, 1971.
30. Karger BL, Snyder LR, Eon C: An expanded solubility parameter treatment for classification and use of chromatographic solvents and absorbents: parameters for dispersion, dipole, and hydrogen bonding interactions, *J Chromatogr* 125:71-88, 1976.
31. Snyder LR: Solvent selection for separation processes. In Perry ES, Weissberger A, editors: *Techniques of chemistry: separation and purification*, ed 3, vol 12, New York, 1978, Wiley & Sons.
32. Glajch JL, Kirkland JJ, Squire KM, Minor JM: Optimization of solvent strength and selectivity for reverse-phase liquid chromatography using an interactive mixture-design statistical technique. *J Chromatogr* 199:57-59, 1980.
33. Snyder LR: Classification of the solvent properties of common liquids, *J Chromatogr* 92:223-230, 1974.
34. Hildebrand JH, Scott RI: *The solubility of non-electrolytes*, ed 3, New York, 1964, Dover Publications; and Hildebrand JH, Scott RI: *Regular solutions*, Englewood Cliffs, N.J., 1962, Prentice-Hall.
35. Snyder LR: Solvent selection for separation processes. In Perry ES, Weissberger A, editors: *Techniques of chemistry: separation and purification*, ed 3, vol 12, New York, 1978, Wiley & Sons.



36. Trappe W: Die Trennung von biologischen Fettstoffen aus ihren natürlichen Gemischen durch Anwendung von Adsorptionsäulen. 1. Mitteilung: Die eluotrope Reihe der Lösungsmittel, *Biochem Z* 305:150-161, 1940.
37. Rohrschneider L: Eine Methode zur Charakterisierung von gaschromatographischen Trennflüssigkeiten, *J Chromatogr* 22:6-22, 1966.
38. McReynolds WO: Characterization of some liquid phases, *J Chromatogr Sci* 8:685-691, 1970.
39. Zlatkin A, Kaiser RE: HPTLC: *high performance thin-layer chromatography*, Journal of Chromatography Library Series 9, New York, 1977, Elsevier Scientific Publishing.
40. Touchstone JC: *Practice of thin layer chromatography*, ed 3, New York, 1992, Wiley & Sons.
41. Halasz I, Sebastian I: New stationary phase for chromatography, *Angew Chem, Int Ed* 8:453-454, 1969.
42. Anderson DMW: Gel permeation chromatography. In Simpson CF, editor: *Practical high performance liquid chromatography*, Philadelphia, 1978, Heyden & Sons.
43. Hunt BJ, Holding SR, editors: *Size exclusion chromatography*, New York, 1989, Chapman & Hall.
44. Tabor MW: Chemical analysis for assessment and evaluation of environmental pollutants: fact or artifact, *Environ Sci Res* 38:205-214, 1990.
45. Smith CC, Khalil A, Tabor MW: Fractionation of urinary and fecal metabolites of the antimalarial drug WR-158,122 following oral doses in rats and rhesus monkey, *Toxicologist* 3:52, 1983.
46. Que Hee SS, Ward JA, Tabor MW, Suskind RR: Screening method for Aroclor 1254 in whole blood, *Anal Chem* 55:157-160, 1983.
47. Stolman A, Pranitis PA: XAD-2 resin drug extraction methods for biologic samples, *Clin Toxicol* 10:49-60, 1977.
48. Weissman N, Lowe ML, Beattie JM, Demetriou JA: Screening method for detection of drugs of abuse in human urine, *Clin Chem* 17:875-881, 1971.
49. Shackleton CHL, Whitney JD: Use of Sep-Pak cartridges for urinary steroid extraction: evaluation of the method for use prior to gas chromatographic analysis, *Clin Chim Acta* 107:231-243, 1980.
50. Heikkinen R, Fotsis T, Adlercreutz H: Reversed-phase C18 cartridge for extraction of estrogens from urine and plasma, *Clin Chem* 27:1186-1189, 1981.
51. Tabor MW, Loper JC: Analytical isolation, separation and identification of mutagens from nonvolatile organics of drinking water, *Int J Environ Anal Chem* 19:281-318, 1985.
52. Horning EC, Horning MG: Metabolic profiles: gas-phase methods for analysis of metabolites, *Clin Chem* 17:802-809, 1971.
53. Riddick JA, Bunger WB: Organic solvents. In Weissberger A, editor: *Techniques of chemistry*, vol 2, ed 3, New York, 1978, Wiley & Sons.
54. DeZeeuw RA, Jonkman JHG, van Mansvelt FJW: Plasticizers as contaminants in high purity solvents: a potential source of interference in biological analysis, *Anal Biochem* 67:339-341, 1975.
55. Denney DW, Karsek FW: Detection and identification of contaminants from foil-lined screw-cap sample vials, *J Chromatogr* 151:75-80, 1978.
56. Hopgood MF: Nomogram for calculating percentage ionization of acids and bases, *J Chromatogr* 47:45-50, 1970.
57. Constable DJC, Smith SR, Tanaka J: Comparison of solvent reduction methods for concentration of polycyclic aromatic hydrocarbon solutions, *Environ Sci Technol* 18:975-978, 1984.
58. Kossa WC, MacGee J, Ramachandran S, Webber AJ: Pyrolytic methylation/gas chromatography: a short review, *J Chromatogr Sci* 17:177-187, 1979.
59. Ko H, Petzold EN: Isolation of samples prior to chromatography. In Tsuji K, Morozowich W, editors: *GLC and HPLC determination of therapeutic agents, part 1*, New York, 1978, Marcel Dekker.
60. Sunshine I: *Manual of analytical toxicology*, Boca Raton, Fla, 1971, CRC Press, Inc.

Bibliografia



Libros

- American Society of Testing Materials: *ASTM standards on chromatography*, ed 2, ASTM Subcommittee E19.07 on Compilation of Chromatographic Methods, Philadelphia, 1989, ASTM.
- Grob RL: *Modern practice of gas chromatography*, ed 2, New York, 1985, Wiley & Sons.
- Heftman E: Chromatography: fundamentals and applications of chromatography and related differential migration methods, ed 5, *Journal of Chromatography Library*, vol 51 A and B, New York, 1992, Elsevier Science Publishers.
- Papadoyannis IN: *HPLC in clinical chemistry, Chromatographic Science Series*, vol 54, New York, 1990, Marcel Dekker.
- Sherma J, Fried B, editors: *Thin layer chromatography, Chromatographic Science Series*, vol 55, New York, 1990, Marcel Dekker.
- Snyder LR, Glajch JL, Kirkland JJ: *Practical HPLC method development*, New York, 1988, Wiley & Sons.

Resúmenes integrales, revistas y series en cromatografía

- Advances in Chromatography*, New York, Marcel Dekker, Inc.
- Analytical Abstracts*, London, Royal Society of Chemistry.
- Chemical Abstracts*, Columbus, Ohio, American Chemical Society.
- Chromatographia*, New York, Pergamon Press.
- Chromatographic Reviews*, Amsterdam, Elsevier Scientific Publishing Co.
- Chromatographic Science Series*, New York, Marcel Dekker, Inc.
- Chromatography Symposium Series*, New York, Elsevier Scientific Publishing Co.
- Gas and Liquid Chromatography Abstracts*, Barking, Essex, Applied Science Publishers.
- Gas Chromatography Abstracts*, London, Butterworth & Co.
- Journal of Chromatography*, New York, Elsevier Scientific Publishing Co.
- Journal of Chromatography Library*, New York, Elsevier Scientific Publishing Co.
- Journal of Chromatographic Science*, Niles, Ill., Preston Publications.
- Journal of High Resolution Chromatography and Chromatography Communications*, Heidelberg, N.Y., Muthing Press.
- Journal of Liquid Chromatography*, New York, Marcel Dekker, Inc.
- Progress in Thin-Layer Chromatography and Related Methods*, Ann Arbor, Mich., Lewis Publishers.

Tablas

Tabla 5-1. Parámetros experimentales que afectan a N.

Parámetros para aumentar N	Dirección del cambio necesario
Velocidad de flujo de la fase móvil	Disminución
Longitud de la columna	Aumento
Tamaño promedio de partícula de la fase estacionaria	Disminución
Distribución de tamaño de partícula	Disminución
Volumen de muestra introducido	Disminución
Viscosidad de la muestra introducida	h Aumento



Viscosidad de la fase móvil	Aumento
Temperatura (ya que afecta la viscosidad de la fase móvil)	Disminución
Efectos no debidos a la columna (como los volúmenes muertos, tubería conectiva excesiva)	Disminución

Tabla 5-2. Clasificación de solventes por grupos de selectividad

Grupo solvente	Clases representativas o ejemplos de compuestos
0	<i>n</i> -Alcanos, ciclohexano, fluorohidrocarburos saturados
1 (I)	Éteres alifáticos, trialkilamines
2 (II)	Alcoholes alifáticos
3 (III)	Derivados de piridina, tetrahidrofurano, amidas
4 (IV)	Glicoles, alcohol bencílico, ácido acético
5 (V)	Cloruro de metileno, cloruro de etileno, bis(2-etoxietil) éter
6 (VIA)	Cetonas y ésteres alifáticos, nitrilos, dioxano, sulfóxidos
7 (VIB)	Nitrocompuestos, fenil alquil éteres, hidrocarburos aromáticos, tetracloruro de carbono
8 (VII)	Halobencenos, difenil éter
9 (VIII)	Fluoroalcanoles, cloroformo, agua

Tabla 5-3. Índices de polaridad de solventes representativos

Solvente	Índice de polaridad	Solventgroup
Isooctano	-0.4	0
Hexano	0.0	0
Tetracloruro de carbono	1.7	7
Éter de dibutilo	1.7	1
Trietilamina	1.8	1
Tolueno	2.3	7
Clorobenceno	2.7	8
Difenil éter	2.8	8
Éter dietílico	2.9	1
Benceno	3.0	7
Bromuro de etilo	3.1	6
Cloruro de metileno	3.4	5
1,2-Dicloroetano	3.7	5
Bis(2-etoxietil) éter	3.9	5
<i>n</i> -Propanol	4.1	2
Tetrahidrofurano	4.2	3
Cloroformo	4.3	9
Acetato de etilo	4.3	6
Isopropanol	4.3	2
2-Butanone	4.5	6
Dioxano	4.8	6
Etanol	5.2	2



Nitroetano	5.3	7
Piridina	5.3	3
Acetona	5.4	6
Alcohol bencílico	5.5	4
Metoxietanol	5.7	4
Ácido acético	6.2	4
Acetonitrilo	6.2	6
Dimetilformamida	6.4	3
Sulfóxido de dimetilo	6.5	6
Metanol	6.6	2
Nitrometano	6.8	7
Agua	9.0	9

Tabla 5-4. Fases estacionarias preferidas

Tipo de la fase	Ejemplos
Dimethylsilicona	OV-1, OV-101, SE-30, SP-2100
Fenilmetilsilicona al 50%	OV-17, SP-2750
Trifluoropropilmetilsilicona	OV-210, SP-2401
Poliétilén glicol	Carbowaxes
Poliésteres	DEGS, EGSS-X, EGA
3-Cianopropilsilicona	Silar 10C, SP-2340, Apolar 10C
De: Hawkes S, Grossman D, Hartkopf A, et al: J Chromatogr Sci 13:115-117, 1975.	

Tabla 5-5. Grupo de solutos seleccionado en orden del aumento de retención en cromatografía de fase normal y de fase inversa

Fase inversa normal	Tipo de soluto	Fase
Mayor retención	Fluorocarbonos	Menor
	Hidrocarburos saturados	
	Hidrocarburos no saturados	
↓	Haluros y ésteres	↓
	Aldehídos y cetonas	
	Alcohol y tioles	
Menor retención	Ácidos y bases	Mayor
retención		

Figuras

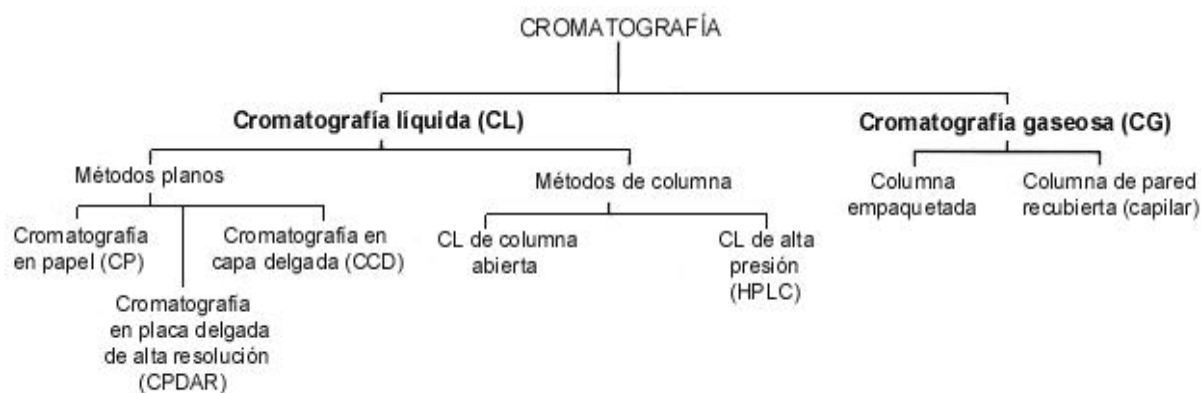


Figura 5-1 Divisiones de la cromatografía de acuerdo a la fase móvil y al aparato físico empleados.

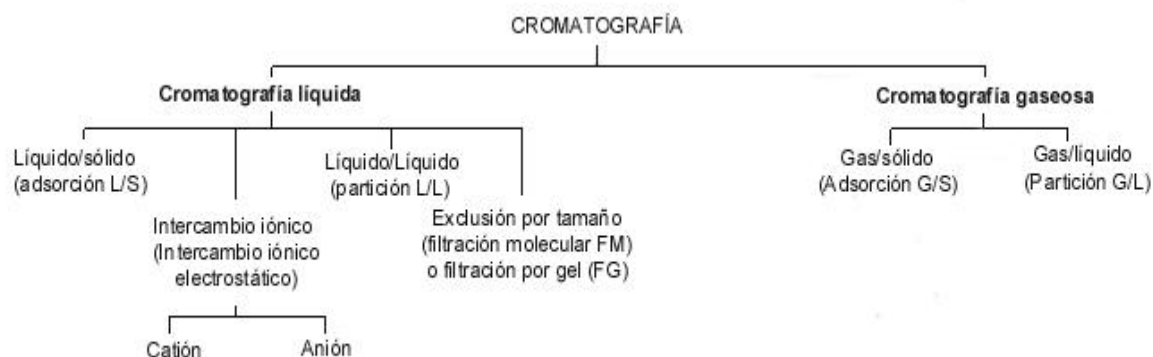


Figura 5-2 Divisiones de la cromatografía de acuerdo al mecanismo de separación de la fase estacionaria.

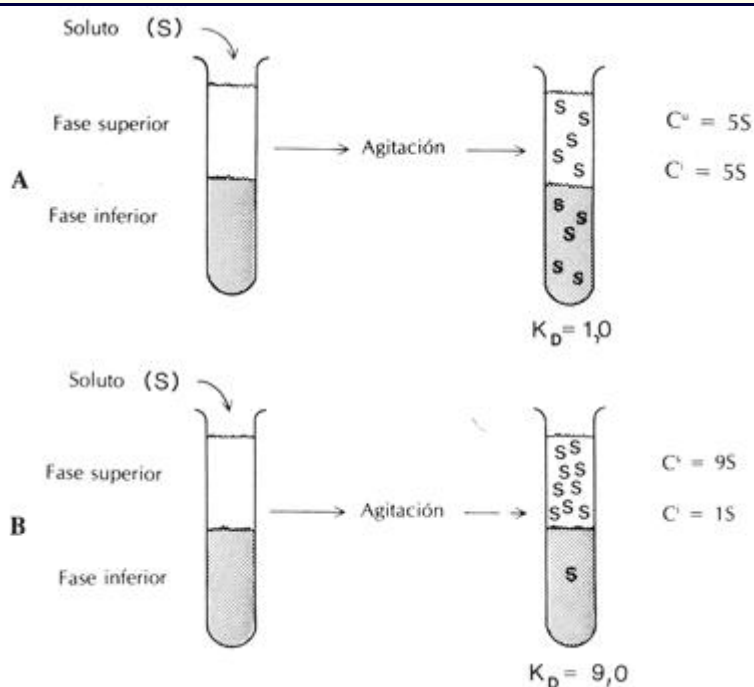


Figura 5-3 Separación de un soluto, S, por partición en dos sistemas de solventes diferentes. En el primer sistema, A, el soluto tiene un coeficiente de distribución, K_D , de 1.0, indicando una partición igual entre las fases superior e inferior después que ocurre la mezcla. En el segundo sistema, B, el soluto tiene un K_D de 9.0, indicando una partición de nueve partes del soluto en la fase superior y una parte del soluto en la fase inferior después de mezclar. C_u es la concentración de la fase superior y C_l es la concentración de la fase inferior.

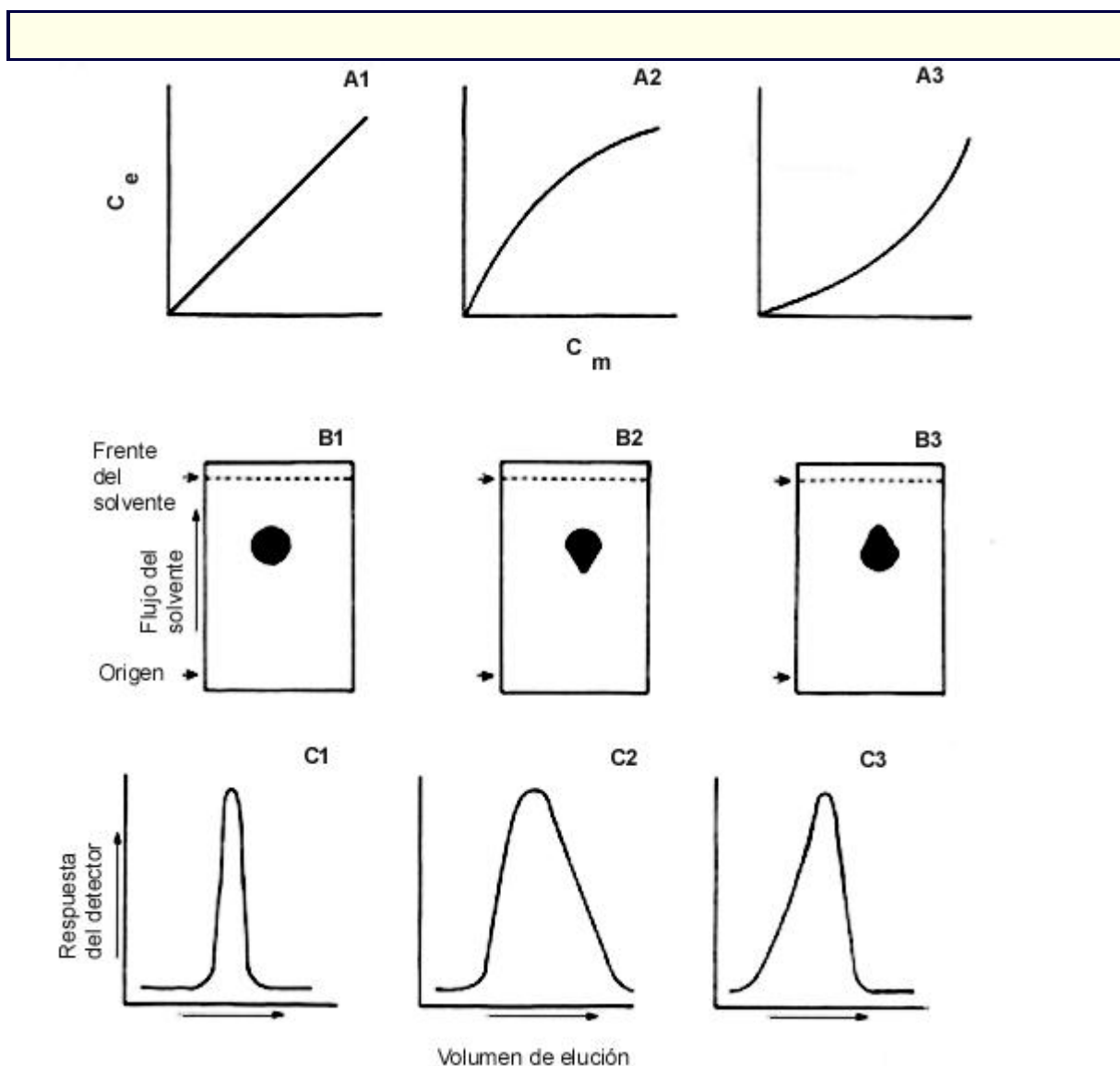


Figura 5-4 Relación entre la isoterma de distribución en el equilibrio (desde A1 hasta A3) y el perfil de elución, forma, y posición del soluto en un cromatograma de PC/TLC (desde B1 hasta B3) o en un cromatograma de GC/HPLC (desde C1 hasta C3). C_s , concentración del soluto en la fase estacionaria; C_m , concentración del soluto en la fase móvil.

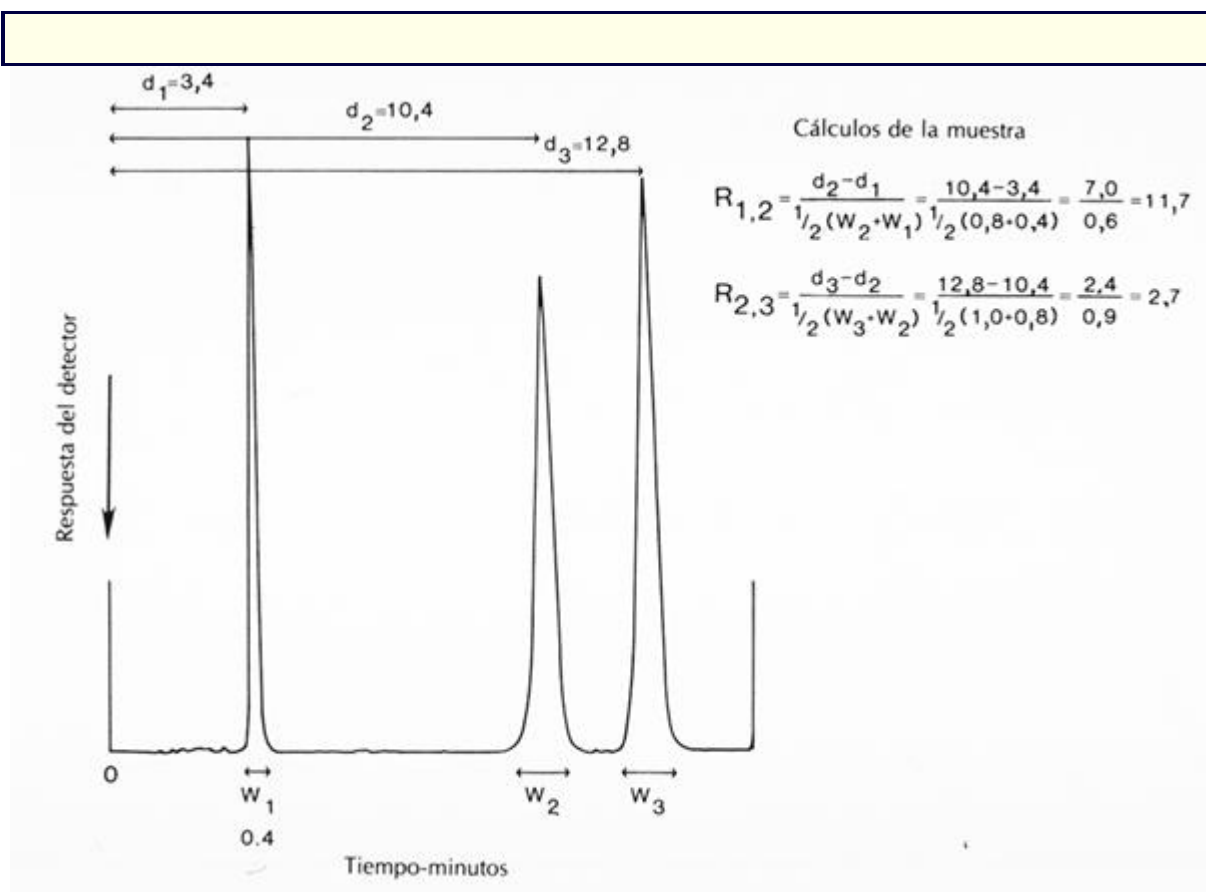


Figura 5-5 Cálculo de la resolución de los componentes de la muestra en una separación real efectuada por HPLC. Las distancias, d_1 hasta d_3 , son las cantidades reales de tiempo desde la inyección (\downarrow) al ápice del pico de elución para cada componente, desde 1 hasta 3, respectivamente. La anchura de los picos, W_1 hasta W_3 , se mide por triangulación a la base de cada pico de los componentes 1 hasta 3, respectivamente. Tanto d como W deben medirse de la misma manera a partir del tiempo de inyección, o sea, en unidades de tiempo (minutos o segundos), longitud (pulgadas o centímetros) o volumen de elución (mililitros). La resolución, R , es adimensional.

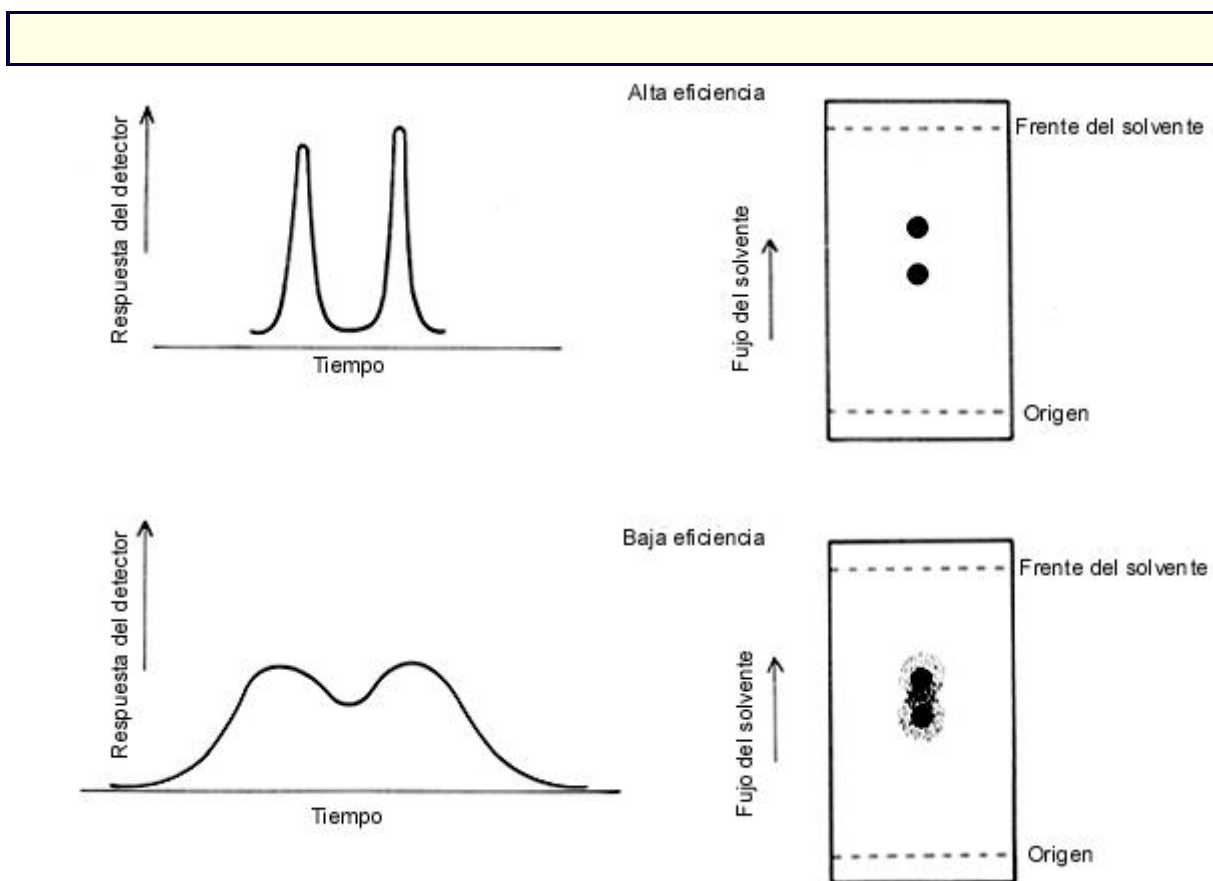


Figura 5-6 Cromatogramas modelo que ejemplifican las separaciones de alta y baja eficiencia.

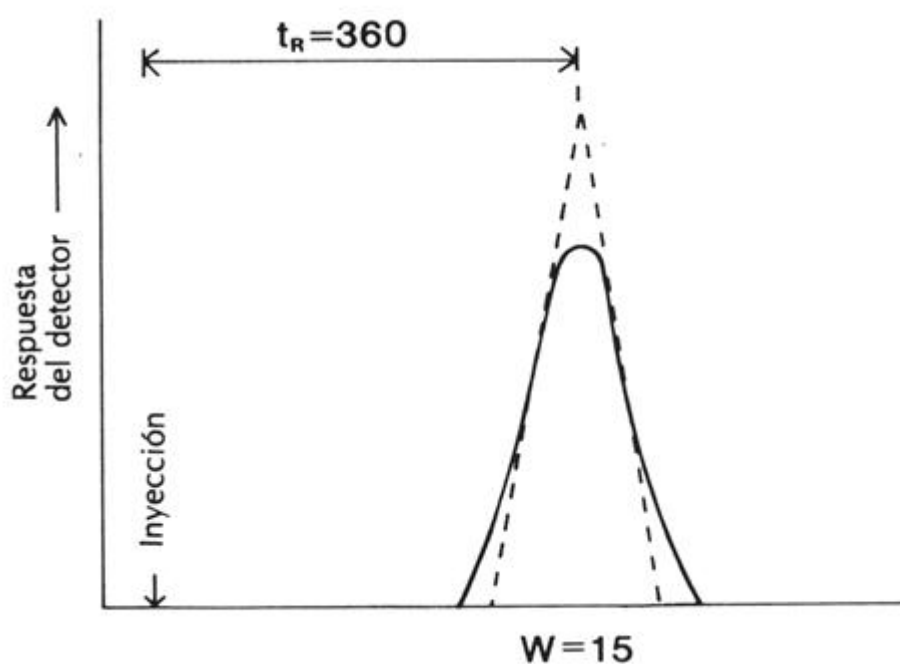


Figura 5-7 Cálculo del número de platos teóricos, N , de un cromatograma de gases o de HPLC. El tiempo de elución o retención, t_R , se mide desde el tiempo de la inyección al ápice del pico de elución del componente. La anchura del pico, W , se mide por triangulación a la base del pico, como se muestra. Tanto t_R como W se miden en las mismas unidades.

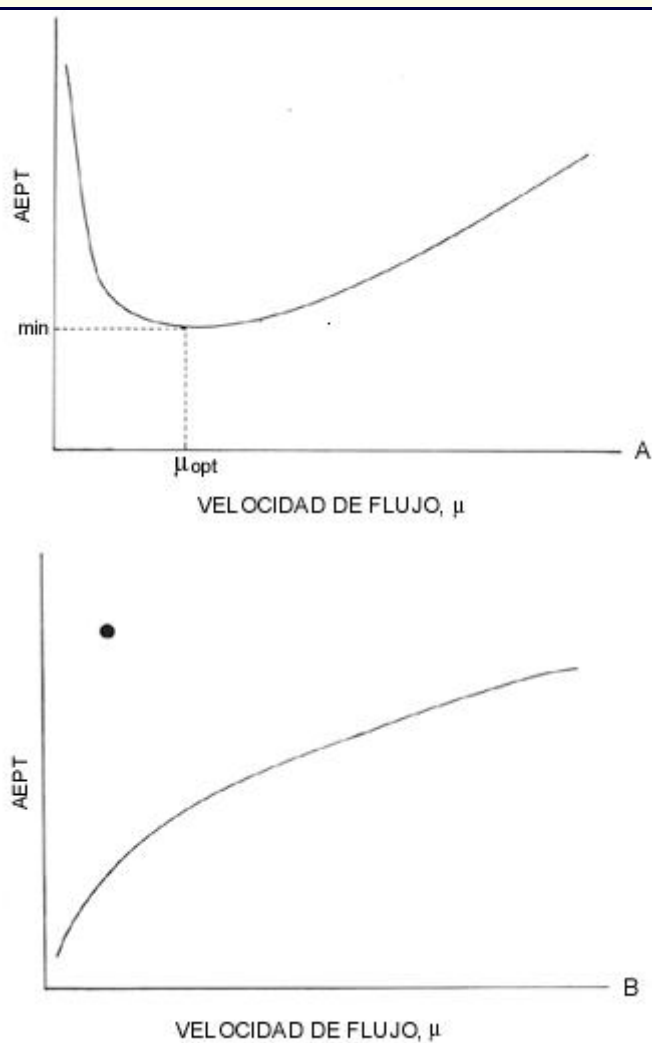


Figura 5-8 La dependencia de la altura del plato teórico, $AEPT$, con respecto a la velocidad de la fase móvil, μ , en la cromatografía de gases, A y en la cromatografía de líquidos, B .

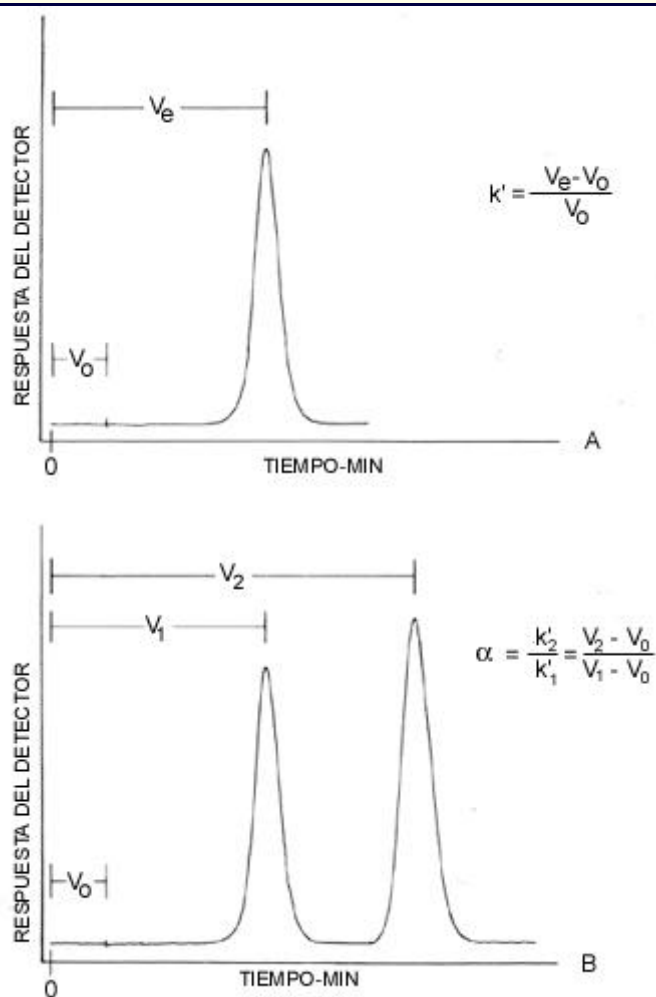


Figura 5-9 A, Cálculo del factor de capacidad, k' , de un cromatograma de HPLC. La muestra fue retenida por la fase estacionaria y sujeta a la cromatografía. B, Cálculo del factor de selectividad, α , de un cromatograma de HPLC. Los solutos A y B fueron retenidos por la fase estacionaria y sujetos a una separación cromatográfica como se indica.

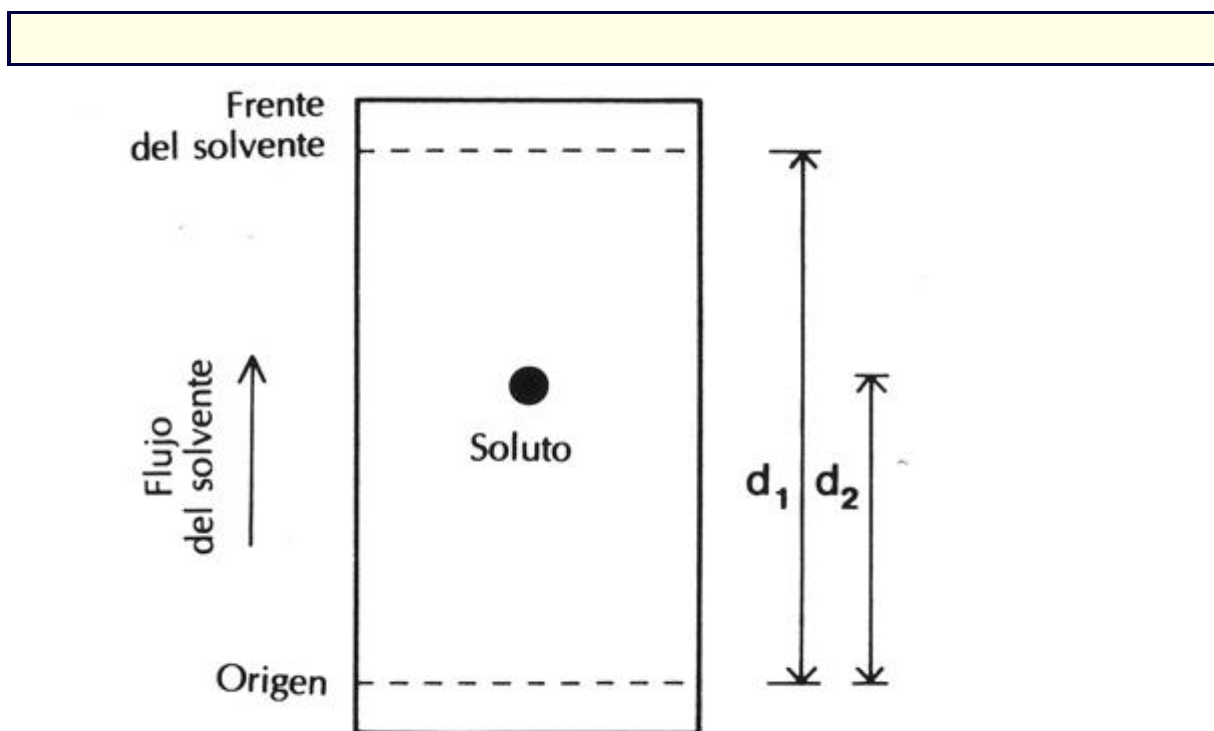


Figura 5-10 Cálculo del valor de R_f (razón del frente del solvente) para un componente de una muestra de un cromatograma en papel o en capa delgada. Se mide la distancia d_1 desde el origen al frente del solvente y la distancia d_2 desde el origen al centro de la mancha del componente separado, como se muestra, en términos de las mismas unidades; o sea, longitud (centímetros o milímetros). El valor R_f resultante, o sea d_2 dividido entre d_1 , es adimensional.

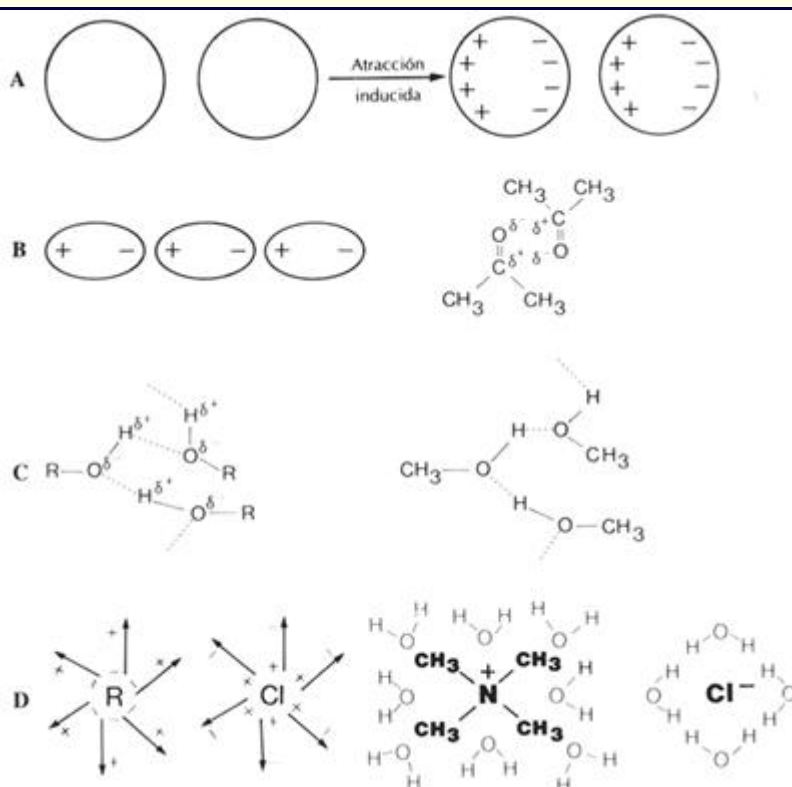


Figura 5-11

Interacciones fisicoquímicas entre las moléculas que constituyen el concepto de polaridad. **A**, Interacciones dispersivas o de van der Waals. **B**, Interacciones dipolares. **C**, Puentes de hidrógeno. **D**, Interacciones electrostáticas.

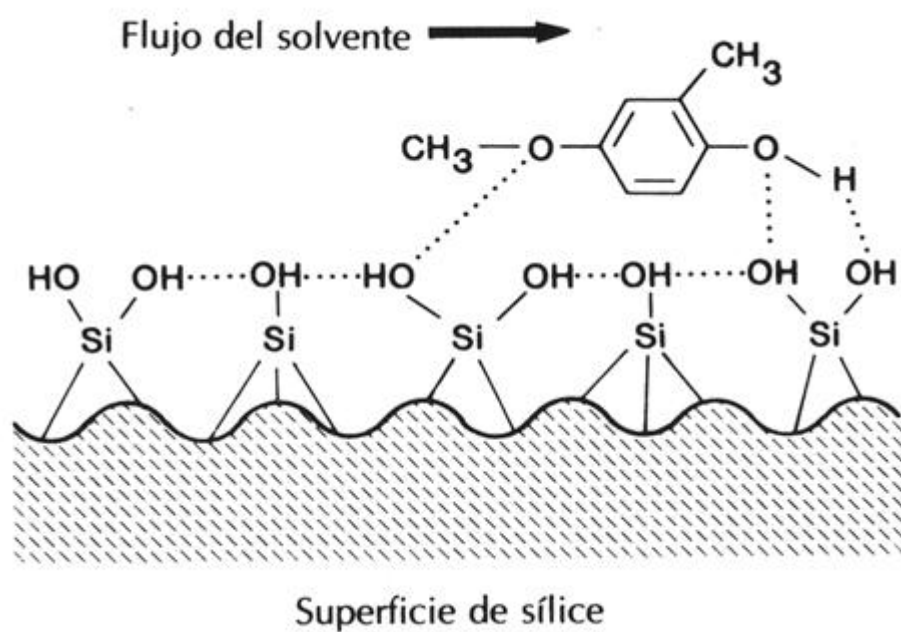


Figura 5-12 Mecanismo de la separación de un metabolito del metilanol por cromatografía de sílice gel. Puentes de hidrógeno,; enlaces covalentes, ____.

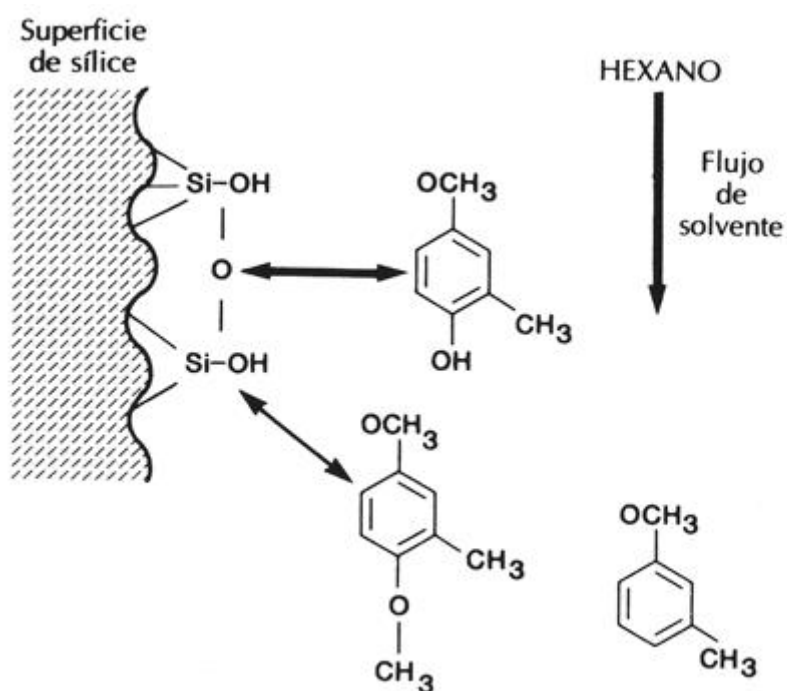


Figura 5-13 Mecanismo de cromatografía de adsorción mediante la separación de 3-metilanisol y dos de sus metabolitos bioquímicos. Los componentes de la muestra más polares, como el 3-metil-4-hidroxianisol, se retienen en su mayoría por la fase estacionaria polar de sílica gel (*flecha gruesa*). Los componentes de la muestra de polaridad intermedia, como el 2,5-dimetoxitolueno, se retienen en un grado mucho menor (*flecha delgada*), mientras que los componentes relativamente no polares, como el 3-metilanisol, no se retienen y prefieren la fase móvil no polar, hexano.

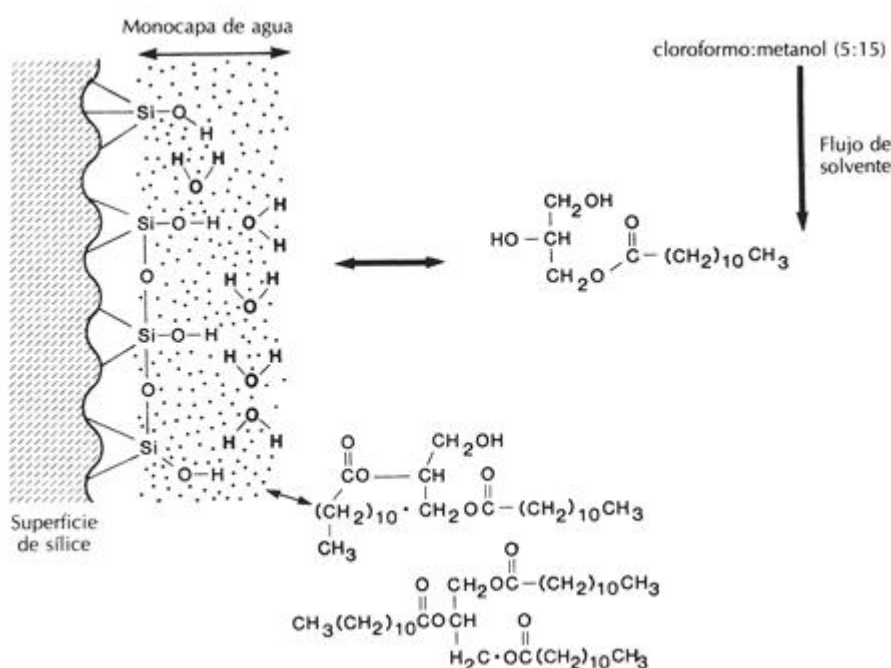


Figura 5-14 Mecanismo de cromatografía líquido/líquido, ejemplificado mediante la separación de monoglicéridos, diglicéridos y triglicéridos del ácido láurico. La fase estacionaria de sílica gel tiene una monocapa de agua sostenida firmemente por puentes de hidrógeno. Las moléculas del soluto se distribuyen entre la fase líquida móvil (cloroformo:metanol) y la fase líquida estacionaria, o sea la monocapa de agua. Los componentes de la muestra más polares, los monoglicéridos, se retienen más por la fase estacionaria polar (*flecha gruesa*). Los componentes de la muestra de polaridad intermedia, como los diglicéridos, se retienen en un grado mucho menor (*flecha delgada*), mientras que los componentes relativamente no polares, como los triglicéridos, no se retienen y prefieren la fase estacionaria, que es relativamente no polar.

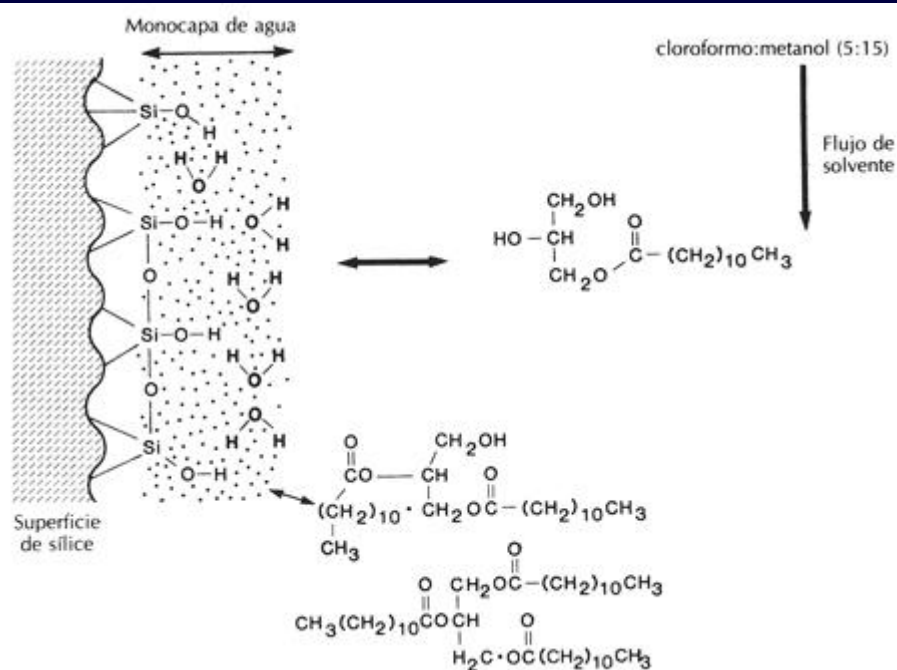


Figura 5-15 Preparación química de fase estacionaria unida, (fase inversa). El organoclorosilano reacciona con los grupos nucleofílicos hidroxilo (OH) de la sílica gel, formando el enlace covalente siloxano (Si-O-Si).

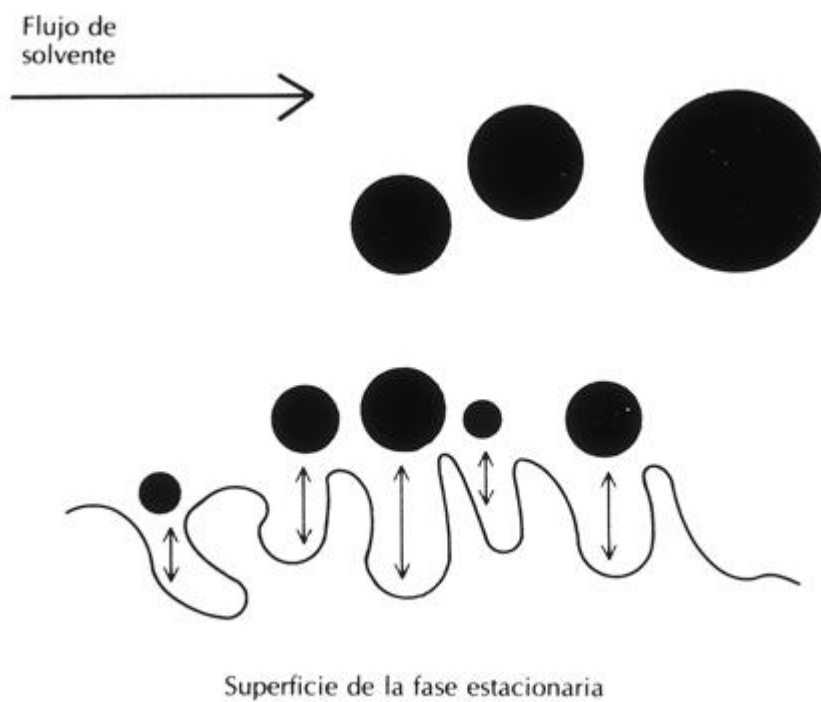




Figura 5-16 Mecanismo de cromatografía de exclusión por tamaño. La fase estacionaria, en forma de cuentas porosas, contiene poros de diámetro variable. La fase móvil fuera y dentro de los poros es la misma, excepto que el líquido de adentro está inmovilizado. Cuando una muestra que contiene solutos que varían desde moléculas pequeñas hasta muy grandes eluye a través de la columna, las moléculas pequeñas penetran todos los poros y se retienen, por lo tanto eluyen después que las moléculas grandes, las cuales se mueven solamente en la fase móvil. Las moléculas del tamaño intermedio penetran solo en algunos poros, por consiguiente se retienen en menor grado que las moléculas pequeñas.

CAPÍTULO 6

6. Cromatografía de Líquidos

David J. Anderson

Larry D. Bowers

Resolución, eficiencia y velocidad de análisis

Resolución

Eficiencia cromatográfica

Velocidad de análisis

Cuantificación

Enfoques

Estandarización

Problemas generales en la elución

Selección de un tipo de cromatografía

Cromatografía de exclusión molecular

Cromatografía de intercambio iónico

Cromatografía de adsorción

Cromatografía de partición y de fase unida

Cromatografía de fase inversa

Cromatografía de pares iónicos

Cromatografía de afinidad

Cromatografía de enantiómeros

Avances recientes en materiales de empaque para HPLC

Avances sobre problemas con soportes de sílice

Medios de acceso restringido

Análisis de macromoléculas de alta eficiencia y alta velocidad



Instrumentación

Sistemas para el suministro de solventes

Sistemas para la introducción de la muestra

Columnas y conectores

Sistemas de detección

Aplicaciones

OBJETIVOS

- Describir las ventajas del uso de la altura de pico o del área de pico para la cuantificación de un compuesto por cromatografía de líquidos.
- Definir estandarización externa, estandarización interna, y adición de estándares; explicar la determinación de concentraciones desconocidas mediante cada uno de los procedimientos de estandarización; establecer los requerimientos para la selección y uso de un estándar interno.
- Discutir los diferentes tipos de cromatografía de líquidos utilizados para separar moléculas y discutir los factores a considerar en la elección de la clase más apropiada.
- Describir los diferentes tipos de material de empaque que pueden obtenerse en el comercio, detallando las ventajas y desventajas de cada uno.
- Esquematizar el sistema básico para cromatografía de líquidos en columna; enumerar los cuatro componentes básicos de un sistema de separación por cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC) y establecer la función de cada uno de ellos.
- Enumerar los cuatro tipos de sistemas de detección utilizados en HPLC, y describir para cada uno el principio de operación, su uso en la práctica, y las ventajas y desventajas asociadas con su utilización.
- Resumir las aplicaciones del HPLC en el análisis de compuestos clínicamente relevantes.

Términos clave

eficiencia Característica de una columna o material de empaque que describe la magnitud del ensanchamiento de los picos cromatográficos. Mayores eficiencias llevan a picos cromatográficos más angostos.

efluente Fase móvil que ha dejado la columna.

eluado Mezcla de sustancias que han sido separadas en la columna y salen de ella.

elución en gradiente Sistema de elución en el que la composición del solvente es modificada durante la corrida.

elución isocrática Elución con una mezcla de solventes de composición constante.

eluyente Fase móvil.

fase estacionaria Parte del sistema de separación que se encuentra inmovilizado en la columna.

fase móvil Mezcla de solventes que es percolada a través de la columna.

fase normal Tipo de cromatografía en el que la fase móvil es menos polar que la fase estacionaria.

fase inversa Tipo de cromatografía en el que la fase móvil es más polar que la fase estacionaria.



fase unida Un material de empaque cromatográfico en el que la fase estacionaria está unida covalentemente a la superficie del soporte.

H Altura equivalente del plato teórico, AETP ("HETP", en inglés).

L Longitud de la columna cromatográfica, normalmente en milímetros.

m Velocidad del solvente en la columna ($m = L/t_0$).

material de empaque Palabra referente al material que se coloca en la columna cromatográfica, y que consiste en la fase estacionaria y el soporte.

N Número de platos teóricos de separación de una columna cromatográfica.

permeabilidad Medida de la facilidad con que la fase móvil puede ser forzada a atravesar la columna.

R_S Resolución; grado de separación entre dos eluados.

soporte Partículas sobre las que se inmoviliza la fase estacionaria.

t₀ Tiempo requerido para eluir una sustancia que no se retiene.

t_R Tiempo de retención; tiempo requerido para eluir una sustancia de una columna cromatográfica.

V₀ Volumen de solvente requerido para eluir un compuesto no retenido; también llamado *volumen muerto*.

V_R Volumen de retención; volumen de fase móvil requerido para eluir un compuesto de una columna cromatográfica al tiempo t_R .

La cromatografía de líquidos es una forma de separación en la que la fase móvil es percolada a través de una columna o una capa fina de partículas. La Fig. 6-1 muestra un diagrama esquemático de una columna cromatográfica usada en cromatografía de líquidos. La fase móvil líquida se extrae de un reservorio y se dirige hacia una columna, normalmente por medio de una bomba. Además, se necesita un método para introducir la muestra en el sistema cromatográfico. El componente más importante de un sistema cromatográfico es la columna. La columna se rellena con *material de empaque*, que consiste de pequeñas partículas (*soporte*) sobre las que son mantenidos sitios específicos o una capa de solvente (ambos referidos como *fase estacionaria*). El establecimiento de un equilibrio diferencial de los compuestos analizados entre la fase móvil y la fase estacionaria da lugar a su separación. Todos los tipos cromatográficos (ver Capítulo 5) pueden ser usados en cromatografía de líquidos. Finalmente, se puede coleccionar el efluente de la columna para análisis ulteriores o analizar el efluente con un detector en línea, como un fotómetro. Pueden recolectarse alícuotas de la fase líquida para un análisis subsecuente si se desea. El registro de cualquier parámetro que permita monitorear el compuesto analizado en función del volumen de elución o del tiempo se denomina *cromatograma*.

La cromatografía de líquidos es apropiada para el laboratorio de análisis clínicos. Debido a que la retención de un compuesto está determinada por un equilibrio, la posición del pico en el cromatograma (o sea, el volumen de retención) puede ser de ayuda en la identificación analítica. Si una sustancia coeluye con un compuesto conocido puede ser el mismo material; una retención idéntica, sin embargo, no es prueba de identidad. Además, puede obtenerse información cuantitativa a partir de la medición de la altura o del área de los picos. Debido a que los componentes de una mezcla están separados, es posible la

cuantificación de varios compuestos en un solo análisis. Tal cuantificación es útil en la medición de fármacos o intermediarios en un camino metabólico (como las porfirinas). Otra ventaja de la cromatografía de líquidos es que los compuestos relativamente polares presentes en los fluidos corporales, son solubles en los solvente normalmente usados como fases móviles. Esto no sucede en cromatografía de gases, que requiere compuestos analizados volátiles. Las proteínas y los péptidos se separan fácilmente en cromatografía de líquidos.

A pesar que la cromatografía de líquidos fue descubierta antes que la cromatografía de gases, fue muy poco usada en el laboratorio de química clínica. La cromatografía de líquidos clásica requiere típicamente horas o días para una separación, mientras que la cromatografía de gases sólo requiere minutos. Con el desarrollo de pequeñas partículas (10 μm) totalmente porosas en los comienzos de la década del '70, la cromatografía de líquidos fue capaz de lograr velocidades y resoluciones comparables a la cromatografía de gases en columnas empacadas (CG). La introducción de fases estacionarias unidas covalentemente resultó en la popularización de la cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC). Los avances tecnológicos, como la automatización mediante microprocesadores, han hecho de la cromatografía tanto analítica como preparativa, fácil de llevar a cabo y más atractiva. En este momento, la cromatografía de líquidos de alta eficacia es reconocida como complementaria a la CG en el análisis cromatográfico.

Resolución, Eficiencia y Velocidad de Análisis

El objetivo de cualquier técnica cromatográfica es separar, o resolver las especies de interés de otros compuestos de interés o de interferencias de la matriz de la muestra. Como analistas, también debe interesarnos la velocidad del esquema analítico, incluyendo las etapas de preparación de la muestra, la separación propiamente dicha, y el cálculo y reporte de los resultados. No es sorprendente que la velocidad de análisis y la resolución estén relacionados. La evolución de la HPLC se basó en el conocimiento y optimización de los factores que afectan la resolución.

Resolución

La separación relativa de dos picos cromatográficos se mide por un parámetro conocido como *resolución*, o R_s . Una definición ulterior de R_s , así como un ejemplo de cálculo de R_s , pueden encontrarse en la página 111 del Capítulo 5. La resolución depende de las posiciones de los centros de los picos que corresponden a cada compuesto y del ancho del pico entre los puntos, donde no se distingue de la señal de base. Si el trazado del pico llega a la línea de base antes que empiece a dibujarse el segundo pico, se dice que se ha logrado resolución a la línea de base. Si el primer pico mostrado en el panel inferior de la Fig. 6-2 fuera colectado hasta el mínimo del valle entre los dos picos, el compuesto en ese pico estaría 100% libre del compuesto que compone el segundo pico. Cuando no se alcanza resolución a la línea de base (Fig. 6-2, panel superior), alguno de los compuestos presentes en el segundo pico serán colectados junto con el compuesto del primer pico. La Tabla 6-1 muestra la impureza relativa del primer pico para varios valores de resolución cuando ambos picos tienen



el mismo tamaño. Snyder y Kirkland cubrieron este tópico más completamente.^{ref(205)} La resolución de los picos también afecta su cuantificación, como se discutirá más adelante.

Debido a que la resolución depende del ancho de los picos, la resolución debe estar controlada por los factores que determinan el ancho de pico, como la eficiencia (N , número de platos teóricos) y la retención relativa. La retención de un pico está determinada por el factor de capacidad (k') y la selectividad (α), como se discutió en el Capítulo 5. La ecuación 6-1 permite el cálculo de la resolución a partir de estos factores.

$$R_s = \left(\frac{\sqrt{N}}{4} \right) \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k'}{1 + k'} \right) \quad \text{Eq. 6-1}$$

El efecto de los cambios en cada uno de estos parámetros sobre la resolución se ilustra en la Fig. 6-2.

Eficiencia cromatográfica

La eficiencia cromatográfica (pág. 112 del Capítulo 5) es una característica de una columna o material de empaque que describe la magnitud del ensanchamiento del pico cromatográfico. Eficiencias altas llevan a picos angostos, alta resolución y alta sensibilidad. La eficiencia de una columna puede ser estimada cuantitativamente a partir de la ecuación de van Deemter:

$$H = A + B/\mu + C\mu \quad \text{Eq. 6-2}$$

donde H es la altura del plato teórico, μ es la velocidad de la fase móvil, y A , B , y C son constantes cuyos valores dependen de los parámetros fundamentales del sistema cromatográfico, como se muestra a continuación:

$$A = 2\lambda_p \quad \text{Ec. 6-3}$$

$$B = 2\lambda_m \quad \text{Ec. 6-4}$$

$$C = \frac{(1 + 6k' + 11k'^2)d_p^2}{24(1 + k')^2 D_m} + \frac{8k'd_f^2}{\pi^2(1 + k')^2 D_s} \quad \text{Ec. 6-5}$$

donde d_p es el diámetro de las partículas del material de empaque; d_f es el espesor de la capa de fase estacionaria, D_m y D_s son los coeficientes de difusión del compuesto analizado en las fases móvil y estacionaria respectivamente; k' es el factor de capacidad, y λ y γ son factores de corrección que tienen en cuenta la falta de homogeneidad del empaque de la columna. Cada término de la ecuación 6-2 describe los diferentes procesos en cromatografía de líquidos que llevan al ensanchamiento de los picos, donde A , B , y C proporcionan las contribuciones del efecto de las distintas trayectorias que puede seguir una molécula a través de la columna, (difusión de Eddy), difusión longitudinal, y transferencia de masa (en las fases móvil y estacionaria) respectivamente. Han sido sugeridas otras expresiones para la cuantificación de



la eficiencia; sin embargo, la ecuación de van Deemter parece ser la más apropiada.^{ref(206)} Se han publicado varios libros que proporcionan más detalles sobre aspectos teóricos de la eficiencia y como éstos se aplican a la cromatografía.^{refs(207)}

Las conclusiones más importantes que se pueden obtener de las ecuaciones 6-2 a 6-5 son que la eficiencia aumenta (H disminuye) con: (1) la disminución del diámetro de partícula del material de empaque; (2) la disminución de la velocidad de flujo de la fase móvil; y (3) el aumento del coeficiente de difusión del compuesto analizado. Debe notarse que la contribución de la difusión longitudinal (término B en la ecuación 6-2) sólo es significativa a bajas velocidades de flujo menores que las velocidades usadas comúnmente en HPLC. La principal característica de diseño empleada para incrementar la eficiencia en sistemas de HPLC ha sido el uso de materiales de empaque de diámetro pequeño. Las técnicas de HPLC utilizan típicamente materiales de empaque con diámetros de 10, 5, y 3 μm . Los materiales de empaque con partículas menores de 3 μm no son usados normalmente por la alta presión que generan cuando se bombea fase móvil a través de la columna. También resulta evidente de las ecuaciones 6-2 a 6-5 el efecto del coeficiente de difusión del compuesto analizado sobre la eficiencia. Como se observa en la ecuación 6-5, las macromoléculas, que poseen coeficientes de difusión más pequeños, darán picos más anchos que las moléculas pequeñas, que tienen coeficientes de difusión mayores. En general, las columnas de HPLC modernas tienen alrededor de 10,000 platos teóricos para moléculas pequeñas.

Para los que practican la cromatografía, son dignos de mención cuatro puntos finales acerca de la resolución. Primero, una columna nueva siempre debe ser probada cuando se recibe para asegurarse que es capaz de obtener una eficiencia razonable. Un valor de eficiencia inicial sirve además como punto de referencia para medir la declinación en el desempeño de la columna a medida que se usa. Segundo, la columna debe ser probada bajo las condiciones de flujo y fase móvil especificadas por el fabricante. El comprador debe saber que una columna probada a 0.1 mL/min para obtener un número alto de platos teóricos, puede no ser la mejor columna para ser usada a velocidades de flujo más prácticas. Tercero, N es en realidad una medida de la eficiencia de todo el sistema. Por consiguiente, un detector de diseño deficiente puede hacer que la mejor columna falle. Para lograr las altas eficiencias reportadas por algunos fabricantes de columnas, todo el sistema debe ser optimizado. Finalmente, recordar que para aumentar la resolución dos veces, uno debe incrementar cuatro veces N . Así pues, el ajuste de N se utiliza para afinar una separación relativamente buena.

La retención de un compuesto en una columna es a menudo determinado por su *factor de capacidad*, k' (ver pág. 113 del Capítulo 5). El factor de capacidad es un factor normalizador que permite comparar la retención en columnas de tamaño diferente, o en columnas operadas a diferentes velocidades de flujo ya que k' , por definición, está relacionada con el equilibrio del compuesto analizado entre la fase móvil y la fase estacionaria. En términos de resolución, los valores de k' por encima de 5 no incrementan mucho la resolución y pueden, de hecho, hacer más lento el análisis y deteriorar el límite de detección. En cromatografía de líquidos, k' puede ajustarse principalmente por cambios en la composición de la fase móvil, aunque también está inversamente relacionado a la temperatura.

La diferencia en retención de dos compuestos medida como el cociente de sus factores de capacidad es llamada *selectividad* k' , o α (ver pág. 115 del Capítulo 5). Debe notarse que si α es grande, habrá una gran diferencia en los volúmenes de retención de los dos

compuestos, y se podrá llevar a cabo la separación con pocos platos teóricos y pequeña retención por parte de la columna. La selectividad frecuentemente se ajusta por cambios en la composición de la fase móvil. Una de las principales ventajas de la cromatografía de líquidos es el amplio rango de selectividades que se pueden lograr variando la composición de la fase móvil. Por ejemplo, una separación por intercambio iónico depende del número de cargas de los compuestos analizados. Nosotros podemos cambiar la selectividad variando el pH de la fase móvil, la fuerza iónica, o la composición salina (NaCl contra LiCl). La selección de una fase móvil requiere la comprensión de los mecanismos de separación y una gran experiencia. Un cambio en la fase estacionaria también puede ser usado para ajustar la selectividad, ya que el equilibrio que se logra entre la fase estacionaria y la fase móvil es la base de cualquier separación cromatográfica. Si la retención de los compuestos analizados es adecuada ($1.5 \leq k' \leq 6$), se puede mejorar la resolución fácilmente cambiando la selectividad.

Velocidad de análisis

Hasta ahora hemos discutido la retención sólo en términos de volumen de fase móvil, V_R , ya que (1) el volumen de fase móvil usada refleja directamente el costo y (2) los cambios en el flujo no afectan V_R . Por el contrario, el tiempo de retención, t_R , es función del flujo y del volumen de retención:

$$t_R = \frac{V_R}{F} \quad \text{Ec. 6-6}$$

donde F es el flujo en mililitros por minuto. Por ejemplo, si el diámetro de la columna se duplicara, su volumen y por lo tanto el volumen de retención se incrementarían por un factor de 4. Nosotros podríamos mantener t_R constante aumentando el flujo 4 veces, pero el consumo de solvente aumentaría en la misma proporción.

La optimización de la velocidad del análisis depende de varios factores. Las referencias más importantes para lograr una separación rápida se muestran en el recuadro. Estos factores son tratados detalladamente por Guichon. [ref\(208\)](#) El tiempo mínimo posible para una separación es el producto del tiempo requerido para que un compuesto recorra un plato y el número de platos requeridos para una resolución adecuada. Cuanto menor sea la altura del plato teórico, H , más rápida será la separación. El tiempo de retención puede incrementarse si se requiere más resolución, mediante bajas selectividades, α ; y a través de factores de capacidad altos, k' . Nuevamente, para obtener separaciones rápidas, debe seleccionarse una fase móvil que maximice α a valores pequeños de k' . En condiciones óptimas, para una separación que requiere 3000 platos, un tiempo de análisis de 100 segundos es factible usando HPLC. Uno de los problemas para pasar de la teoría a la práctica en el laboratorio clínico es que el compuesto analizado debe ser separado de un metabolito desconocido o de uno interferente, y por lo tanto α se desconoce durante el desarrollo de la separación. En este caso, es aceptable un tiempo de separación mayor, y debe confiarse en que la selectividad del detector indique algún problema potencial.

**Consideraciones Prácticas en la Velocidad de
Análisis**

$$t_R = N \cdot \frac{H}{\mu} \cdot (1 + k')$$

$$L = NH$$

$$\Delta P = NH\mu \cdot \frac{\eta}{K_o}$$

μ , Velocidad del solvente en la columna (= L/t_0); η , Viscosidad del solvente; K_o , Permeabilidad de la columna (Ver referencia [5ref\(209\)](#) para más detalles). ΔP , Contrapresión en la columna.

Cuantificación

Estrategias

La cuantificación en cromatografía de líquidos se logra cuando se relaciona la altura o el área del pico con la concentración del compuesto analizado en la muestra. El perfil cromatográfico es un registro de la concentración del compuesto o compuestos analizados que son determinados por el detector. A la altura máxima del pico

$$C_{\max} = \frac{C_s V_s}{V_R} \sqrt{\frac{N}{2\pi}}$$

Ec. 6-7

C_s y V_s son la concentración y volumen de muestra inyectada, respectivamente, V_R es el volumen de retención, y N es el número de platos teóricos. Cuanto mayor sea la altura de un pico para cualquier concentración dada, más sensible es el método. Entonces, minimizando el volumen de retención y maximizando el número de platos teóricos, el ensayo resultará más sensible. Los factores que disminuyen el volumen de retención son un volumen muerto y un factor de capacidad pequeños. Un alto número de platos teóricos puede ser logrado trabajando a flujos bajos y con diámetro pequeño de partículas de soporte. También debe ser notado que, a diferencia de la sensibilidad de la cromatografía de gases, la sensibilidad de la cromatografía de líquidos puede aumentarse inyectando mayores volúmenes de muestra. La altura del pico puede ser relacionada a la concentración en la muestra por un factor de sensibilidad, S . El factor de sensibilidad cambiará si el volumen de retención cambia, haciendo la operación diaria difícil pero no imposible.

Ejemplo. Si la misma muestra fuera inyectada en una columna de 4.6 mm de diámetro interno (ID) y en una de 2.1 mm de ID, ¿cuál sería el tamaño relativo de los picos si todo lo demás permaneciera igual?

$$C_{\max} = \frac{1}{V_R} \left[C_s V_s \sqrt{\frac{N}{2\pi}} \right] = \frac{1}{\Phi \pi^2 L} [\bar{C}] \quad \text{Ec. 6-8}$$

donde Φ , es el volumen muerto, r es el radio, y L es la longitud (15 cm) de la columna; C barra es la masa inyectada en la columna. Si Φ y L son los mismos para las 2 columnas, entonces

$$\frac{C_{\max} (2.1)}{C_{\max} (4.6)} = \frac{(2.3)^2}{(1.05)^2} = 4.8 \quad \text{Ec. 6-9}$$

Por lo tanto el pico de la columna de 2.1 mm de diámetro sería casi 5 veces más grande. Esta ventaja con respecto a la sensibilidad es la causa del interés en aumento por las columnas de pequeño diámetro.

¿Cuánto debería disminuirse la longitud de la columna para observar un incremento similar en la altura del pico? ¿Qué factor haría cambiar la disminución en longitud que la disminución en radio no lo hiciera (k' ; α ; o N)?

La segunda posibilidad para la cuantificación de un compuesto es la medida del área del pico. Aunque hay otros métodos de integración, los integradores basados en microprocesadores resultan tan accesibles que ahora se utilizan ampliamente para la medida del área de los picos. La mayoría de los detectores usados en cromatografía de líquidos son dependientes de la concentración, o sea que miden una concentración en la celda de flujo. En contraste, la mayoría de los detectores usados en CG son dependientes del flujo de masa. El pico obtenido en un detector dependiente de la concentración es inversamente proporcional al flujo. Por lo tanto, si el flujo cambia durante una corrida cromatográfica habrá variaciones significativas en el área de los picos. Además, se requerirá menos resolución para un grado igual de exactitud cuando se usan las alturas de los picos y no sus áreas debido a que la superposición de los picos, aún con una resolución de 1.0, afecta el área de los picos pero no su altura. [ref\(210\)](#) Una regla práctica dice: Usar la altura del pico cuando hay picos interferentes o cuando se requiere máxima exactitud, pero usar el área del pico cuando esencialmente se requiere precisión. Para picos que están apenas sobre la línea de base, siempre debería usarse la altura de los mismos.

Estandarización

La estandarización en cromatografía de líquidos (LC) puede lograrse por 3 caminos diferentes: estandarización externa, estandarización interna o adición de estándares. Para la estandarización externa, se construye una curva de calibración con los valores de la altura o el área de los picos, obtenidos con concentraciones conocidas del compuesto analizado y un volumen de inyección constante. La pendiente de la curva es el factor de sensibilidad, S , en unidades de altura de pico dividido entre unidades de concentración (por ejemplo mm/mM). La concentración del compuesto desconocido se calcula simplemente dividiendo la altura de su pico por el factor de sensibilidad. Debe notarse que, si la curva de calibración es una recta, el factor de sensibilidad puede ser obtenido a partir de un solo estándar. En este caso sería

importante ensayar varias muestras conocidas para verificar la validez del factor de sensibilidad. Las principales causas de error en la calibración externa son las pérdidas variables en los pasos previos al análisis cromatográfico y la variabilidad de la inyección de muestra. Es entonces importante tratar los estándares y las muestras de la misma manera. Debe ser posible lograr una precisión del 1% con calibración externa, pero normalmente se observan valores de hasta 5%.

La estandarización interna usa un compuesto estructuralmente similar al compuesto analizado para corregir los errores debidos a pérdidas durante la preparación de la muestra e imprecisión en la inyección. Antes del pretratamiento y la cromatografía se agrega la misma cantidad de estándar interno a cada muestra y estándar. Después se construye una curva de calibración con la relación de alturas o áreas de pico del estándar y el estándar interno a diferentes concentraciones de estándar (Fig. 6-3). Nuevamente, se puede determinar la concentración de una muestra desconocida usando el factor de sensibilidad o interpolando el valor en una curva de calibración. Es de esperar que las pérdidas o variaciones que ocurran afectarán en forma equivalente al compuesto analizado y al estándar interno. En la práctica, esto es difícil de lograr. Un estándar interno puede ser usado no sólo para mejorar la exactitud y precisión sino también como control de calidad, ya que su altura de pico debería ser la misma en todos los cromatogramas. En la elección de un estándar interno deben cumplirse varios requerimientos, que se resumen en el recuadro de la pág. 134. En algunos casos los estándares internos no mejoran la exactitud y pueden deteriorar la precisión por la imprecisión inherente al manejo de dos picos. La precisión que puede ser lograda en HPLC ha sido estudiada y las fuentes de error han sido analizadas.[ref\(211\)](#)

El último de los métodos de calibración -la adición de estándares- requiere que sean realizados dos análisis de cada muestra y entonces no es tan popular como los otros métodos. Después que la muestra es analizada una vez, se le agrega una cantidad conocida del compuesto de interés en una cantidad muy pequeña de manera que no haya una dilución significativa, y la muestra se vuelve a analizar. Para corregir el error debido a variabilidad en la extracción, la adición debería ser realizada al fluido biológico, y el esquema analítico completo debería ser repetido. Se pueden obtener datos cuantitativos a partir de la altura o área de los picos antes y después de la adición del estándar. La adición del estándar puede también ayudar a la identificación del pico ya que ambos deben coeluir si se trata del mismo compuesto. La inversa no es verdad, ya que más de un compuesto puede eluir con el mismo volumen de retención.

Requerimientos para la Selección y Uso del Estándar Interno (IS)

1. El standard interno debe estar completamente resuelto de todos los picos de la muestra.
2. Debe ser eluido en una posición cercana a la del compuesto analizado, de preferencia con una k' de $\pm 30\%$.
3. Si deben efectuarse correcciones por pérdidas en el pretratamiento, el standard



interno debe comportarse en forma similar al compuesto analizado. Esto puede requerir más de un estándar interno.

4. Debe dar un pico cuya altura o área sean aproximadamente iguales a un estándar en el rango de concentración deseado.
5. No debe estar normalmente presente en la muestra.
6. Debe estar comercialmente disponible en forma pura.
7. Debe ser agregado en forma líquida.

Problema General de la Elución

A veces se requiere que el sistema cromatográfico separe compuestos que aunque están estructuralmente relacionados, se comportan en forma bastante diferente en el sistema de separación. En la Fig. 6-4, la separación de conjugados de ácidos biliares ilustra el problema. Cuando la composición de la fase móvil se ajusta para lograr la resolución de los picos 2 y 3, el pico 8 es retenido más de 30 minutos. Como no hay otros picos cerca del pico 8, la excesiva separación entre los picos 7 y 8 representa una pérdida de tiempo de análisis. Una fase móvil de composición constante es conocida como *isocrática*. Una alternativa a esta situación es cambiar la composición de la fase móvil durante la corrida cromatográfica. Esto puede llevarse a cabo mediante un simple cambio de una fase móvil a otra (gradiente en etapas) o como un cambio continuo en alguna de diferentes formas (gradiente lineal, lineal segmentado o exponencial). En las referencias 7 a 9 puede encontrarse un tratamiento completo de la elución en gradiente. Resumiendo, el volumen de retención de un pico, anchura, y resolución están determinados principalmente por la velocidad de cambio en la composición del solvente. Entonces, muchos de los conceptos discutidos antes no son válidos en la elución en gradiente. Cualquier análisis cuantitativo realizado usando la elución en gradiente debe ser cuidadosamente documentado. En HPLC, el dispositivo para variar la composición de la fase móvil puede ser comprada como una parte del sistema dispensador del solvente, lo que generalmente eleva el costo en forma considerable.

Una desventaja de la elución en gradiente es que la columna requiere equilibramiento con las condiciones originales de fase móvil antes de la corrida siguiente. Esto puede llevar un tiempo considerable, particularmente en el caso de análisis por cromatografía en fase inversa. Como consecuencia, las técnicas isocráticas son las usadas predominantemente en el laboratorio de clínico.

Selección de un Tipo de Cromatografía

En el Capítulo 5 fueron discutidos los diferentes mecanismos de la cromatografía: intercambio iónico, exclusión molecular (permeación en geles o exclusión estérica), adsorción y partición (fases normal e inversa). Como se mencionó previamente, todos estos modos



están disponibles en cromatografía de líquidos. La selección del “mejor” abordaje es un problema primordial para el analista. La selección se realiza sobre la base del conocimiento del mecanismo de cada modalidad y sus fortalezas y debilidades, y frecuentemente se logra con experiencia. La Fig. 6-5 ilustra un método para seleccionar un tipo cromatográfico usando consideraciones mecanísticas. Además de estos tipos, se han usado técnicas más especializadas como la cromatografía de afinidad y técnicas cromatográficas para la determinación de enantiómeros.

Cromatografía de exclusión molecular

Una de las primeras consideraciones de los profesionales de la cromatografía es el tamaño de las moléculas a separar. Si las moléculas son relativamente grandes (>100.000 daltones), la separación por tamaño o estérica (“Steric Exclusion Chromatography” o “SEC”, en inglés) es una primera elección lógica. Si, en cambio, los pesos moleculares son menores de 1000, la exclusión estérica no es probablemente método de elección.

Cromatografía de intercambio iónico

Otro factor clave que afecta la elección de un modo de separación depende de si el compuesto analizado es un ion o si tiene algún grupo ionizable. El intercambio iónico sería una elección lógica para moléculas que pueden estar cargadas, independientemente de su tamaño molecular. El intercambio iónico se basa en la interacción de las cargas del compuesto analizado con un grupo de carga opuesta unido al soporte cromatográfico. Se puede variar la retención cambiando el pH o la fuerza iónica. Cuanto mayor sea el número de cargas del compuesto analizado, mayor será la retención. El aumentar la fuerza iónica, y con ello el número de grupos cargados (como el Na^+) que compiten con el compuesto analizado por los sitios de intercambio en el soporte, reduce la retención. La cromatografía de *pares iónicos*, que utiliza materiales de empaque de fase inversa, puede también ser usada para separar compuestos iónicos (ver pág. 139).

Cromatografía de adsorción

Si la molécula tiene un peso molecular menor de 1000 y no es ionizable, debe usarse otra característica del compuesto para lograr la separación. Tal característica es la capacidad del compuesto para formar uniones de puentes de hidrógeno. La cromatografía de adsorción se basa en la interacción del compuesto analizado con un sitio de unión tridimensional localizado en la matriz de soporte, que puede involucrar uniones de puentes de hidrógeno. Por consiguiente la estructura y polaridad del soluto son importantes para la retención. Por ejemplo, sería relativamente fácil separar *p*-dinitrobenceno de *o*-dinitrobenceno usando cromatografía de adsorción debido a las diferencias estructurales entre los dos compuestos. Por otro lado, la separación de ácido caproico (con 6 átomos de carbono) de ácido caprílico (con 8 átomos de carbono) sería muy difícil debido a que las partes de las moléculas que interactúan con la fase estacionaria son idénticas.

En cromatografía de adsorción, los compuestos son eluidos de la columna por la competencia entre el compuesto analizado y el solvente por el sitio de unión. Un solvente que eluye compuestos más rápidamente y por lo tanto compite mejor por los sitios

cromatográficos es llamado “solvente fuerte”. El agua sería un solvente fuerte para los adsorbentes de sílica debido a que interactúa fuertemente con los grupos silanol (SiOH) responsables del mecanismo de adsorción. Un solvente que no compite bien por los sitios es llamado “solvente débil”. El hexano sería un solvente débil para los adsorbentes de sílica. Es posible ajustar la fuerza del solvente usando mezclas de solventes. Snyder¹⁰ desarrolló una escala de fuerza de los solventes llamada serie eluotrópica y extendió la teoría de la fuerza del solvente a mezclas binarias y terciarias.^{ref(212)} Es interesante destacar que las mezclas de solventes de la misma fuerza pueden mostrar diferencias en selectividad, porque la teoría de Snyder sólo considera el proceso de adsorción, mientras que en realidad el soluto puede también interactuar con el solvente.

Una última consideración en cromatografía de adsorción es el control de la “actividad” del adsorbente. La sílica contiene varios tipos de grupos silanoles, que interactúan en forma diferente con varios tipos de compuestos. Una pequeña cantidad de agua, metanol, acetonitrilo, isopropanol, u otro solvente fuerte se usa para bloquear los sitios más fuertes, dando como resultado una superficie de adsorción más reproducible. Este problema ha llevado a algunos investigadores a evitar los sistemas de adsorción, lo que probablemente es innecesario. Una separación que comprende compuestos desde polaridad intermedia hasta no polares que pueden formar puentes de hidrógeno o que tienen isómeros, probablemente se logrará fácilmente mediante cromatografía de adsorción

Cromatografía de partición y de fase unida

Las interacciones entre el soluto y la fase estacionaria en la cromatografía de partición no están tan bien definidas como en los sistemas de adsorción. Cualquier fuerza química que existe entre moléculas puede ser usada en los sistemas basados en la partición, incluyendo los puentes de hidrógeno, las fuerzas de van der Waals, las interacciones entre iones, etc. (ver Capítulo 5). La base de los sistemas de partición es la distribución de un soluto entre dos capas de solvente líquido, una estacionaria y la otra móvil. Básicamente, equivale a miles de extracciones en fase líquida que ocurren en una columna. En la cromatografía de partición clásica, un líquido polar como β , β' -oxidipropionitrilo (β , β' -ODPN), recubría las partículas de soporte, y un solvente inmiscible como el hexano se usaba como fase móvil. Debido a que las interacciones solvente-soluto comprenden toda la molécula, un sistema típico de partición como el que se describió separaría una serie homóloga (ácidos carboxílicos de C6, C7 y C8) y algunos isómeros de posición. Un sistema de partición con una fase estacionaria polar y una fase móvil no polar se denomina *fase normal* porque fue el primer sistema desarrollado. Más tarde, se desarrolló un sistema con una fase estacionaria no polar como el escualeno, como una mezcla acetonitrilo-agua, y se lo denominó *fase inversa*. Ambos tipos de cromatografía de partición líquido-líquido tuvieron muchos problemas relacionados con la solubilidad limitada de cada solvente en los otros. Por ejemplo, β , β' -ODPN se disolvería lentamente en el hexano y cambiaría lentamente la cantidad de fase estacionaria, lo que a su vez modificaría los volúmenes de retención de los compuestos analizados. La temperatura debía ser cuidadosamente controlada, y la elución en gradiente no era posible en cromatografía de partición. Estos problemas dificultaron el uso de la cromatografía de partición en el laboratorio clínico.

Todo esto cambió con el desarrollo de las fases estacionarias químicamente unidas.

Estos materiales son preparados por unión covalente de una molécula orgánica sobre la superficie de una partícula de soporte, normalmente sílice. Los grupos orgánicos comprenden funciones no polares como octadecilsilano (ODS o C18) u octilsilano (C8), y grupos polares, como los silanos de cianopropilo (CN), aminopropilo (NH_2), o glicidoxipropilo (diol). Las ventajas de las fases unidas son (1) los compuestos iónicos y polares son fácilmente separados, (2) la fase estacionaria no se va perdiendo, (3) puede realizarse elución en gradiente, y (4) las columnas son fáciles de usar y mantener. La principal desventaja de las fases unidas es que a pHs por debajo de 2, se rompe la unión covalente del grupo unido al soporte y a pHs por encima de 8 se disuelven los soportes a base de sílice. Desde que la mayoría de las separaciones en el laboratorio clínico pueden ser llevadas a cabo dentro de estos límites de pH, las fases unidas son muy populares. Se ha incluido una sección separada más adelante, para discutir la variedad de separaciones que se pueden realizar con sistemas de fase inversa.

Cromatografía de fase inversa

Debido a la popularidad de la cromatografía de fase inversa, más adelante se amplía la discusión de esta técnica. Según una encuesta reciente realizada a usuarios de HPLC, aproximadamente el 50% de las separaciones por HPLC fueron realizadas en columnas de fase inversa.[ref\(213\)](#) El material de empaque de fase inversa más popular es el octadecilsilano (ODS, o C18). La fase móvil más común en fase inversa es agua conteniendo un modificador orgánico como metanol, acetonitrilo o tetrahidrofurano. En general, la retención de un compuesto analizado en una columna de fase inversa dependerá de la proporción relativa de las características polar y no polar del compuesto analizado, como lo muestra la Fig. 6-6 para el aminoácido tirosina. La retención sobre un material de empaque de fase inversa se ve favorecida por el aumento de carácter no polar del compuesto analizado, mientras que la residencia en la fase móvil, que lleva a una elución rápida de la columna, es favorecida por un aumento de la funcionalidad polar presente en el compuesto analizado. El modificador orgánico de la fase móvil compite con la fase estacionaria por la parte no polar de la molécula del compuesto analizado, y consecuentemente la retención disminuye al aumentar la cantidad de modificador orgánico en la fase móvil. El mecanismo de retención en la cromatografía de fase inversa unida ha sido revisado.[refs\(214\)](#) Aunque algunos autores proponen un mecanismo de partición (en el que el soluto está completamente rodeado por la fase estacionaria), también ha sido propuesto un mecanismo de adsorción (en el que el soluto es retenido sobre la fase estacionaria sólo a través de un contacto superficial) o una combinación de ambos.

Consideraciones sobre la fase estacionaria.

Como se estableció antes, la separación obtenida para cualquier grupo de compuestos es una función tanto de la fase estacionaria como de la fase móvil. El analista tiene la posibilidad de variar las condiciones de la fase móvil pero es dependiente de los fabricantes para la fase estacionaria, particularmente en el caso de los materiales de empaque de fase unida. Si uno debe llevar a cabo una cromatografía reproducible, el comportamiento de la fase estacionaria hacia los compuestos no polares, polares e iónicos debe ser el mismo de columna a columna y de lote a lote. Además, la duración de las columnas es importante debido a su precio. En los últimos años se han logrado mejoras significativas en estas características, pero hay algunas limitaciones para producir columnas con materiales de fase inversa absolutamente



reproducibles.

La preparación de una fase estacionaria octadecilsilano (ODS) se lleva a cabo normalmente haciendo reaccionar los grupos silanol (SiOH) de la sílica gel con un octadecilsilano como el octadecildimetilclorosilano. La superficie resultante contiene grupos octadecilo unidos a la superficie por uniones siloxona (Si-O-Si) como se muestra en la Fig. 6-7. La mayoría de los fabricantes de columnas usa silanos con un sólo grupo cloruro, y la fase estacionaria resultante es denominada *monomérica*. Debido a la estereoquímica de la superficie de la sílica gel, sólo alrededor de un tercio de los grupos silanoles pueden reaccionar con los grupos ODS. Los grupos silanoles remanentes son polares y pueden interactuar con los compuestos analizados polares, cambiando la selectividad de la fase estacionaria. El trimetilclorosilano puede reaccionar con alrededor de un 20% adicional de los grupos silanoles superficiales, dando como resultado un incremento en el carácter no polar del soporte (Fig. 6-7). Este proceso, llamado de *cobertura terminal*, es usado en muchos materiales de empaque que se obtienen comercialmente. Como podría esperarse, las diferencias en la morfología superficial de la sílica gel, las condiciones de reacción para la unión del ODS, y la presencia o ausencia de recubrimiento terminal, hace que las columnas provenientes de distintos fabricantes se comporten en forma diferente. De hecho, las variaciones de lote a lote de un material de empaque pueden ser bastante apreciables en las separaciones obtenidas para ciertos análisis. Además no es sorprendente que la adaptación de un método a un laboratorio pueda requerir cambios significativos en la fase móvil si se usa una columna C18 de un fabricante distinto al mencionado en el reporte original. La elección de una columna de fase inversa todavía requiere ensayo y error. Para el principiante, el uso de una marca de columna mencionada en una publicación puede garantizar la obtención de cromatogramas aceptables en un tiempo razonable. La situación con respecto a columnas está mejorando a medida que se logra un mejor conocimiento del esqueleto de la sílice.

Consideraciones respecto de la fase móvil.

La potencia real en la cromatografía de líquidos deriva del hecho que cambios en la composición en la fase móvil pueden tener efectos importantes sobre la selectividad y por lo tanto en la resolución. En los sistemas de fase inversa, dos tipos de cambios pueden realizarse: (1) cambiar del tipo de solvente orgánico usado, y (2) adiciones a la fase móvil que afecten el pH, fuerza iónica o capacidad complejante. Se ha reconocido por algún tiempo que el tipo de solvente orgánico usado tiene efecto sobre la retención y selectividad. En algunos casos, un cambio de metanol a acetonitrilo altera el orden de elución de los compuestos. Desafortunadamente hasta ahora el uso de solventes para variar la selectividad es empírico, y la función exacta de cada solvente en una separación no está bien entendida; sin embargo, la fuerza relativa de los solventes está bien definida y por lo tanto la capacidad para eluir solutos, aumenta en el orden siguiente: metanol < DMSO < etanol \leq acetonitrilo < tetrahidrofurano < dioxano < isopropanol. Como regla, cuando se está ajustando la retención de un soluto, un incremento de 10% en la fracción de solvente orgánico (como metanol o acetonitrilo) en agua causa una disminución de 2 ó 3 veces en el valor de k' .

Supresión de iones. Las modificaciones en la fase móvil que cambian la retención del compuesto analizado a través de introducción de un segundo proceso de equilibrio químico en la fase móvil, han sido usadas desde que surgió la cromatografía de fase inversa.^{ref(215)} El primer intento fue controlar el pH para afectar la retención. Si, por ejemplo, el ácido



ascórbico debía ser separado por HPLC, habría una gran influencia del pH sobre la retención. A pHs por encima del pK_a de ácido ascórbico, el ácido estaría desprotonado y cargado, y entonces no se distribuiría fuertemente hacia la fase estacionaria no polar. La retención sería relativamente baja. Por otro lado, a pHs por debajo del pK_a , el ácido estaría protonado y no cargado, y por lo tanto sería retenido más fuertemente. En la zona de alrededor una unidad de pH a cada lado del pK_a , la retención cambia rápidamente en función del pH, como lo muestra la Fig. 6-8. El uso del control del pH para incrementar la retención de ácidos ha sido denominado *supresión de iones*. Es un método muy útil para ajustar el comportamiento de retención. Para controlar el pH normalmente se usan soluciones amortiguadoras. Es importante recordar que un par ácido-base es un buen amortiguador, sólo dentro en el intervalo de una unidad de pH del pK_a . La Tabla 6-2 enumera algunos amortiguadores útiles en HPLC de fase inversa.

Cromatografía de compuestos básicos en materiales convencionales de empaque para fase inversa.

Los compuestos básicos pueden ser analizados cromatográficamente en materiales convencionales de empaque para fase inversa haciendo modificaciones en la fase móvil. La mayor dificultad para el análisis de compuestos básicos en materiales de empaque para fase inversa basados en sílice, es la presencia de grupos silanol en la superficie. Como se mencionó previamente, aproximadamente 50% de los grupos silanol no se modifican luego de la síntesis del material de empaque de fase inversa. Un pequeño porcentaje de estos silanoles remanentes es muy reactivo, conduciendo a efectos cromatográficos adversos, como coleadas severas, adsorción irreversible de compuestos básicos y retención variable en diferentes columnas de fase inversa. Un compuesto analizado básico estará cargado positivamente a los pHs de fase móvil que se usan normalmente en análisis de fase inversa (pH neutro). Los grupos silanoles reactivos de la superficie de la sílice, que son ácidos y por lo tanto cargados negativamente, interactúan con el compuesto básico cargado positivamente a través de un mecanismo de intercambio iónico. La adición de modificadores aminados (como la trietilamina) a la fase móvil, previene los efectos cromatográficos adversos del silanol sobre los compuestos analizados básicos. Esto se lleva a cabo a través de un mecanismo en que el modificador aminado cargado positivamente se une a los sitios de intercambio iónico de los silanoles presentes en el material de empaque de fase inversa, bloqueándolos y evitando su interacción con el compuesto analizado básico. Las fases móviles de pH bajo y alta fuerza iónica, que desplazan el equilibrio de los grupos silanoles hacia la forma protonada o contraiónica (que no interactúa con los compuestos básicos cargados positivamente), son estrategias adicionales usadas en la cromatografía de fase inversa convencional para compuestos básicos. Además del mecanismo de intercambio iónico de grupos silanol mencionado, se les ha atribuido a los puentes de hidrógeno del silanol y las impurezas metálicas presentes en la sílice los efectos cromatográficos adversos observados en los soportes a base de sílica.

Cromatografía de pares iónicos^{ref(216)}

El método más popular para análisis cromatográficos de compuestos ionizables (como bases o ácidos débiles) así como de compuestos iónicos en una columna de fase inversa, es por

cromatografía de pares iónicos. La cromatografía de pares iónicos presenta ciertas ventajas sobre la cromatografía de supresión de iones y la cromatografía de intercambio iónico. El uso de supresión de iones que emplea materiales de empaque para fase inversa basados en sílica está limitado por el rango de estabilidad al pH de la sílica (que es estable desde pH 2 hasta 8). Entonces, el requerimiento de una fase móvil de pH bajo para la cromatografía de supresión de iones de ácidos débiles limita la vida de la columna, mientras que la supresión de iones para bases débiles no es posible en los materiales de fase inversa basados en sílica, ya que se requiere un pH demasiado alto. La ventaja de la cromatografía de pares iónicos sobre la cromatografía de intercambio iónico es que puede separar compuestos iónicos y no iónicos simultáneamente.

En la cromatografía de pares iónicos, una especie iónica hidrofóbica (*contraión*) que tiene carga opuesta a la del compuesto analizado es agregada a la fase móvil, la cual es bombeada a través de la columna de fase inversa. El complejo resultante del contraión y el compuesto iónico sujeto a la separación se denomina *par iónico*. Se han propuesto varios mecanismos de retención para la cromatografía de pares iónicos, pero el mecanismo exacto todavía es materia de debate. La retención normalmente se explica por uno de dos modelos básicos. Un modelo explica el papel del contraión como un agente neutralizante, que se combina con el ion del compuesto analizado en la fase móvil para formar una especie neutra, que es retenida por la columna de fase inversa. El otro modelo explica la función del contraión como un modificador de la fase estacionaria, con la adsorción del contraión sobre el material de empaque de fase inversa, convirtiendo el material de empaque en un intercambiador iónico, que retendrá al compuesto analizado iónico.

La optimización de la separación cromatográfica de pares iónicos se logra a través de la manipulación de variables relacionadas a la fase móvil, que comprenden el tipo y concentración del par iónico, pH, tipo y concentración del modificador orgánico, fuerza iónica y temperatura.

Los tipos más comunes de reactivos de apareamiento iónico son los alquil o aril sulfonatos (RSO_3^-), alquil sulfatos (ROSO_3^-), y perclorato (ClO_4^-), que son contraiones usados para la cromatografía de especies catiónicas, y las aminas cuaternarias (NR_4^+), que son contraiones catiónicos para la cromatografía de especies aniónicas. Como podría esperarse, la retención de un compuesto analizado (que se une al contraión) aumenta con el incremento en la longitud de la cadena alquilo del par iónico y también con su concentración. Estos dos efectos se muestran en la Fig. 6-9, en la que la retención de la epinefrina aumenta cuando (1) la longitud de la cadena del par iónico se incrementa de butil sulfonato a decil sulfonato, y (2) cuando la concentración de cualquier par iónico se eleva (hasta un punto donde la solubilidad del par iónico es limitada o hay efecto de saturación, en el que la concentración del par iónico adsorbido sobre el material de empaque de fase inversa es limitada). Debe notarse que los compuestos analizados que no se unen al contraión disminuyen su retención al aumentar la concentración del par iónico (las especies neutras muestran una ligera disminución en su retención, mientras que los compuestos analizados iónicos que tienen la misma carga que el contraión muestran un pronunciado descenso en su retención).

El ajuste del pH es también crítico en la cromatografía de pares iónicos. El pH de la fase móvil afecta la retención mediante el control de la carga de los compuestos sujetos al análisis y los contraiones que son ácidos o bases débiles. En general, la retención aumenta a



valores de pH en los que el contraión y el compuesto analizado están completamente cargados, lo que ocurre a valores intermedios de pH. Por ejemplo, en la cromatografía de un ácido débil usando una base débil como contraión (o viceversa, un compuesto analizado que es una base débil y un contraión que es un ácido débil), el pH debe estar entre el pKa del ácido y la base, de manera que ambos estén cargados. Para compuestos analizados que tienen diferentes pKs, la separación puede ser afectada cambiando el pH.

La retención puede también ser ajustada a través de la manipulación de la concentración de un modificador orgánico (como acetonitrilo), la fuerza iónica, y la temperatura. Al aumentar la concentración de modificador orgánico disminuye la retención, lo cual se atribuye a la menor fuerza de adsorción del par iónico a la columna de fase inversa. El aumento de la fuerza iónica disminuye la retención por la menor formación de pares iónicos entre el compuesto analizado y el contraión como resultado de la unión competitiva de la sal al contraión o al compuesto, o a ambos. El efecto de la temperatura sobre la retención no es predecible, dependiendo de cada par iónico.

La selección del tipo de columna de fase inversa no es un factor crítico que afecta la selectividad de una separación en cromatografía de pares iónicos. La longitud de cadena y el contenido carbonado del material de empaque son importantes para la determinación de la concentración del par iónico y del modificador orgánico requeridos para obtener tiempos de retención razonables. Sin embargo, se gana poco en términos de optimización de la separación al cambiar tipos de columnas de fase inversa. Las columnas C18 son las usadas más a menudo en cromatografía de pares iónicos.

Cromatografía de afinidad^{refs(217)}

Una herramienta poderosa en el análisis de compuestos bioquímicos es la cromatografía de afinidad. Este tipo de cromatografía emplea el principio de la interacción específica entre pares bioquímicos. Algunos ejemplos de pares bioquímicos usados en cromatografía de afinidad se muestran en la Tabla 6-3. En cromatografía de afinidad uno de los componentes del par (llamado *ligando de afinidad*) se inmoviliza sobre un soporte con el que se empaca una columna, lo que la hace una técnica cromatográfica muy específica para el componente complementario del par.

Hay tres etapas en el proceso cromatográfico de separación por afinidad. La primera es la inyección de la muestra en el *amortiguador de aplicación* (acuoso, y normalmente a pH 7) que se bombea a través de la columna, reteniéndose solamente el compuesto analizado complementario mientras que el resto de las especies pasan sin retenerse. Luego que todos los componentes no retenidos pasaron a través de la columna, se inicia la segunda etapa del proceso cromatográfico, en el que la fase móvil es cambiada a un *amortiguador de elución* acuoso, que destruye las fuerzas de unión entre el compuesto analizado y el ligando de afinidad, conduciendo a la elución del compuesto analizado de la columna. Hay dos categorías de amortiguadores de elución: generales y bioespecíficos. Los amortiguadores de elución bioespecíficos contienen una especie que interactúa específicamente con el ligando de afinidad o compuesto analizado, provocando la elución. La elución bioespecífica agrega una segunda etapa de especificidad al proceso cromatográfico porque entonces habrá especificidad no sólo en la retención sino también en la elución del compuesto analizado. Ejemplos de elución bioespecífica son la adición de azúcares a la fase móvil en cromatografía de afinidad con

lectinas como ligandos, o inhibidores enzimáticos en la cromatografía de afinidad de enzimas. Los amortiguadores de elución generales afectan la elución por medios inespecíficos, como ruptura de puentes electrostáticos, puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, y fuerzas hidrofóbicas. Las estrategias para la elución general comprenden cambios en el pH o fuerza iónica de la fase móvil, adición de modificadores orgánicos o de agentes desnaturizantes (urea 5 a 8 M o guanidina 6 M). La desventaja de la elución general es que las especies que se adsorben inespecíficamente al soporte pueden eluir junto con el compuesto analizado. La tercera etapa del proceso cromatográfico de afinidad es la reequilibración de la columna con el amortiguador de aplicación, antes de la inyección de la próxima muestra.

Tradicionalmente la cromatografía de afinidad ha sido relegada a funciones de purificación, ya que en el pasado sólo se disponía de soportes hidrofílicos polisacarídos de diámetro de partículas grande (en la cromatografía de afinidad, se requieren los soportes hidrofílicos para minimizar la adsorción inespecífica o la desnaturización de biomacromoléculas). Estos soportes de bajo desempeño tienen baja eficiencia y no tienen la fuerza mecánica suficiente para resistir las altas presiones generadas por el uso de altos flujos en HPLC. Los anchos picos y largos tiempos de análisis hicieron que la cromatografía de afinidad convencional no pudiera ser usada como una herramienta analítica. Esto cambió con el desarrollo de los soportes de sílica de alto desempeño, en los que la superficie fue modificada por la unión covalente de una capa hidrofílica. Además, se han desarrollado soportes poliméricos hidrofílicos de alta eficacia. La *cromatografía de afinidad de alta eficacia* se lleva a cabo mediante la incorporación de material de empaque de alto desempeño, con ligandos de afinidad covalentemente unidos, a las columnas normales de HPLC.

La cromatografía de afinidad que usa columnas con ácido *m*-aminofenilborónico es comúnmente empleada en el laboratorio clínico para la determinación de hemoglobina glicada, la cual se utiliza para la evaluación del tratamiento de la diabetes. Dicho ligando es de tipo general ya que une compuestos que contienen un grupo funcional *cis*-diol, que está presente en compuestos tales como catecoles, carbohidratos y la porción del carbohidrato de muchas glicoproteínas. En la determinación de hemoglobinas glicadas, el hemolisado de glóbulos rojos se inyecta en una columna con ácido *m*-aminofenilborónico unido, que retiene las hemoglobinas glicadas mientras que las no glicadas pasan a través de la columna. Las hemoglobinas glicadas luego se eluyen cambiando la fase móvil por una que contiene el azúcar alcohol sorbitol y el eluyente se monitorea a 415 nm.

La cromatografía de afinidad adquiere una flexibilidad ilimitada si se usan anticuerpos como ligandos de afinidad, una subclasificación de la cromatografía de afinidad conocida como *cromatografía de inmunoafinidad*.

Cromatografía de enantiómeros^{refs(218)}

La separación de enantiómeros (compuestos quirales) tiene su mayor aplicación en la determinación de productos farmacéuticos, ya que aproximadamente el 50% de las drogas más frecuentemente usadas existen como pares enantioméricos. Un compuesto que tiene un centro quiral (átomo de carbono que tiene unidos 4 grupos diferentes) existe en dos formas isoméricas que difieren en la disposición espacial de los átomos alrededor del centro quiral. Cada uno de los pares enantioméricos tiene propiedades idénticas (haciendo difícil su



separación) pero difieren en su reactividad hacia los reactivos quirales y en su reactividad en sistemas biológicos. La actividad, metabolismo, y a veces la toxicidad de una droga depende de la forma enantiomérica, y por lo tanto la separación de los enantiómeros es crucial en el análisis farmacéutico. La HPLC es el método de elección para la determinación de enantiómeros.

Hay tres métodos generales para la determinación de enantiómeros por HPLC: cromatografía en columnas convencionales luego de la derivatización con un reactivo quiral, cromatografía en columnas convencionales usando fases móviles conteniendo reactivos acomplejantes quirales, y cromatografía en columnas que contienen una *fase estacionaria quiral*.

La derivatización del compuesto analizado enantiómero con un reactivo quiral, lleva a la formación de un diastereoisómero. Se forma un determinado diastereoisómero cuando un enantiómero particular reacciona con el reactivo derivatizante, mientras que cuando reacciona el otro enantiómero se forma un diastereoisómero diferente. Los diastereoisómeros tienen diferentes propiedades físicas, lo que facilita su separación en columnas de HPLC convencionales. De una manera similar, la presencia de reactivos quirales en la fase móvil lleva a la formación de un diferente complejo de diastereoisómeros por cada componente de un par enantiomérico particular. Estos complejos de diastereoisómeros pueden ser fácilmente separados por columnas de HPLC convencionales.

Un material especial de empaque que contenga un compuesto quiral como fase estacionaria separa enantiómeros debido a la interacción espacial diferencial de cada enantiómero con el soporte quiral. La determinación de enantiómeros usando columnas con fases estacionarias quirales es más conveniente en comparación con los métodos de derivatización o de adición de acomplejantes a la fase móvil, porque estos métodos requieren reactivos que tienen un alto grado de pureza óptica. Las fases estacionarias quirales comprenden derivados de aminoácidos de tipo Pirkle o dipéptidos, ciclodextrina, proteínas como albúmina o glicoproteína α 1 ácida, polímeros con estructuras helicoidales, y ligandos quirales de intercambio (que consisten en un ligando inmovilizado con un metal de transición unido). Hay muchos tipos diferentes de fases estacionarias quirales en el comercio, y su utilidad para una separación particular debe ser determinada empíricamente, de manera que no hay una fase estacionaria quiral universal aplicable a todas las separaciones de enantiómeros; la elección de la columna dependerá de cada caso particular.

Avances Recientes en Materiales de Empaque para HPLC

Ha sido publicada información útil sobre materiales de empaque para HPLC.^{ref(219)} Las Tablas 6-4 a 6-6 contienen un resumen de la información general y enumeran los tipos de material de empaque disponibles comercialmente para los diferentes modos de HPLC. Se han logrado avances en los materiales de empaque en 3 líneas: (1) desarrollo de materiales de empaque diseñados para solucionar en parte los problemas de los soportes de la sílica; (2) desarrollo de materiales de empaque, conocidos como medios de acceso restringido, que permiten la cromatografía directa del suero (o plasma); y (3) desarrollo de soportes de mayor eficiencia para macromoléculas. En la Tabla 6-6, los materiales de empaque para adsorción y los que contienen ligandos polares unidos están agrupados en la categoría de cromatografía de



fase normal, lo que es consistente con la clasificación propuesta por otros autores, ya que ambos son materiales de empaque polares.

Avances con respecto a problemas de los soportes de sílica

El uso de soportes de sílica tiene problemas asociados como el rango limitado de pH útil ($2 < \text{pH} < 8$), bajo desempeño en la cromatografía en fase inversa de compuestos básicos, y problemas de reproducibilidad. Un material de soporte ideal debería tener el alto desempeño y resistencia a la presión de los soportes de sílica y a la vez funcionar en un rango amplio de pH, ser inerte, y tener características de retención reproducibles. Han sido desarrollados soportes que son en algunos aspectos mejores que los basados en la sílica pero peores en otros aspectos. [ref\(220\)](#) Estos serán descriptos a continuación.

Soportes poliméricos de alta eficacia. [refs\(221\)](#)

Se han realizado avances significativos en los últimos años para mejorar los soportes poliméricos de bajo desempeño (baja presión de operación, materiales de empaque de baja eficiencia, usos sólo en purificación) y transformarlos en soportes de alta eficacia (alta presión de operación, alta eficiencia, usos tanto analíticos como en purificación). Los soportes poliméricos pueden ser clasificados como hidrofóbicos o hidrofílicos. El poli(estireno-divinilbenceno) (PS-DVB) fue el primer soporte polimérico para HPLC y es el que predomina dentro de los hidrofóbicos. El poli(alquil metacrilato) (PAM) es otro soporte hidrofóbico. Los principales soportes poliméricos hidrofílicos que se encuentran en el comercio son el alcohol polivinílico (PVA) y la agarosa eslabonada covalentemente. Los usos de estos soportes se muestran en las Tablas 6-4 a 6-6. Los ligandos están covalentemente unidos a estos soportes para producir materiales de empaque de fase inversa, intercambio iónico o fase normal. Los soportes de exclusión molecular no requieren ninguna modificación. Debe tenerse en cuenta que los materiales de empaque de fase inversa PS-DVB son usados a menudo sin modificación de su superficie. Estos materiales de empaque PS-DVB nativos, sin embargo, tienen selectividades diferentes de las de los materiales de empaque convencionales de fase inversa con grupos alquilo unidos. Los soportes PS-DVB requieren una modificación para hacer más hidrofílica su superficie y así poder ser utilizados en modos distintos que los de fase inversa.

Los soportes poliméricos tienen dos ventajas sobre los de sílica. La primera es el rango extendido de pH de uso. Todos los soportes poliméricos mencionados tienen un rango de pH de por lo menos 2 a 12 (hasta 14). Esto permite la determinación por fase inversa de un compuesto básico sin la necesidad del uso de pares iónicos. Se pueden utilizar fases móviles de pH alto, permitiendo que los compuestos básicos sean analizados cromatográficamente como especies neutras y de esa manera puedan ser retenidos en la columna de fase inversa. La segunda ventaja de los soportes poliméricos es que no tienen sobre su superficie grupos funcionales reactivos como los silanoles y por lo tanto no producen picos con cola y problemas de recuperación cuando se someten a la cromatografía compuestos básicos.

La principal desventaja de los soportes poliméricos es que son menos eficientes que los de sílica (20,000 a 50,000 platos teóricos por metro para los soportes poliméricos). Los soportes PS-DVB también requieren por lo menos 10% a 20% de solvente orgánico en la fase

móvil para prevenir la contracción del material de empaque. Comparativamente, los soportes poliméricos hidrofílicos son menos susceptibles a los efectos de expansión y contracción cuando se cambia la concentración de modificador orgánico, por consiguiente estos soportes son compatibles con fases móviles totalmente acuosas. Una desventaja de los soportes poliméricos hidrofílicos es que están sujetos a limitaciones de presión, lo que puede limitar su uso a flujos muy elevados. Los límites superiores de presión son de 4500 a 6000 psi para soportes de PS-DVB, de 2000 a 2900 psi para los soportes de PHAM y PVA, y 200 a 400 psi para los soportes de agarosa eslabonada covalentemente (comparados con la asignación de presiones mayores de 6000 psi de operación para la mayoría de los materiales empaque de sílica). Para los soportes PHAM y PVA, pueden ser empleados flujos de hasta 1.5 a 2.0 mL/min (columna de 15 cm x 4.6 mm). Los geles de agarosa eslabonada covalentemente tienen mayores restricciones de flujo.

Los empaque poliméricos todavía no han sido caracterizados suficientemente con respecto a su reproducibilidad

Otros materiales de empaque de alta eficacia.

Además de los materiales de empaque poliméricos, han sido desarrollado otros para solucionar los problemas asociados con los soportes de sílica. Varios fabricantes han desarrollado materiales de empaque de fase inversa de sílica desactivada, que no requieren la presencia de modificadores aminorados en la fase móvil para llevar a cabo la cromatografía de compuestos básicos. Estos materiales de empaque emplean sílica de alta pureza con bajo contenido de metales traza. Algunas de las siguientes estrategias pueden ser usadas para volver a desactivar la sílica: exceso de recubrimiento terminal, alta densidad de ligando alquílico, recubrimiento de la superficie de la sílica con una capa de polímero, empleo de tratamientos patentados para modificar la reactividad y distribución de los silanoles sobre la superficie, unión de ligandos nuevos, y la protección electrostática de la superficie de la sílica. Como en el caso de los materiales de empaque convencionales de sílica, estos materiales están limitados a un rango de pH de 2 a 8 en la fase móvil, aunque algunos fabricantes aseguran un incremento en el límite superior de pH hasta 10 en algunos soportes de sílica recubierta de polímero.

Hay otros materiales de empaque disponibles en el comercio. Los de fase inversa basados en alúmina operan en un rango de pH de 2 a 13. El grafito poroso es un material que tiene características de retención de fase inversa, con la posibilidad adicional de poder separar isómeros geométricos y retener compuestos hidrofílicos, un rango de pH mayor (1-14), y mejor desempeño con solutos básicos. El grafito poroso es considerablemente más hidrofóbico que la sílica convencional de fase inversa, por lo que requiere una mayor concentración de modificador orgánico en la fase móvil.

Medios de acceso restringido[*ref\(222\)*](#)

Normalmente es necesario eliminar las proteínas de las muestras de plasma o suero antes de la cromatografía en fase inversa o fase normal, debido a que la composición orgánica de las fases móviles usadas en estas formas cromatográficas causa la desnaturalización y precipitación de las proteínas, las que se adsorben sobre el material de empaque y conducen a un aumento en la presión de trabajo, y disminución de la eficiencia y capacidad de la columna.



Los materiales de empaque conocidos como *medios de acceso restringido* permiten la inyección directa de muestras de suero o plasma sin ningún pretratamiento. Los diferentes tipos de medios de acceso restringido disponibles comercialmente se muestran en las Tablas 6-4 y 6-6. Estos materiales de empaque consisten en una fase estacionaria de sílica cubierta por una barrera hidrofílica. La barrera hidrofílica permite el paso de pequeñas moléculas hacia el interior de la fase estacionaria mientras que impide estéricamente el paso de moléculas grandes como las proteínas. Las técnicas de acceso restringido no requieren preparación de la muestra, debido a que son más simples y rápidas que las de HPLC convencional. Las desventajas derivan de sus menores límites de detección ($\mu\text{g/mL}$) y la dificultad inherente en la determinación de compuestos que están fuertemente unidos a las proteínas u otras macromoléculas.

Análisis de macromoléculas de alta velocidad y eficiencia

Convencionalmente, las macromoléculas son analizadas cromatográficamente en soportes que tienen poros suficientemente grandes para que dichas macromoléculas entren en ellos (diámetros de poro entre 30 y 400 nm), y la cromatografía de las moléculas más pequeñas se lleva a cabo sobre soportes con menores tamaños de poro (diámetros de 5 a 15 nm). Cuando se realiza un análisis de macromoléculas por HPLC, se obtienen picos más anchos que los que normalmente se observan en la HPLC de pequeñas moléculas. Esta disminución en la eficiencia se debe a que las macromoléculas, que tienen menores coeficientes de difusión, se mueven más lentamente dentro y fuera de los poros del material de empaque. Este fenómeno produce que la resolución y la sensibilidad se reduzcan y que el tiempo de análisis aumente. Para solucionar este problema, recientemente se han desarrollado 2 tipos de material de empaque: materiales no porosos y de perfusión.

Los materiales de empaque no porosos no tienen poros accesibles a las macromoléculas y por lo tanto la eficiencia para las macromoléculas es mayor, llevando a separaciones rápidas y de alta resolución. Las desventajas de estos materiales de empaque son una menor capacidad (1% a 10% de la correspondiente a los soportes convencionales) y contrapresiones altas (resultantes del pequeño diámetro de partículas de los soportes, 1 a 3 mm). La razón de que exista una capacidad disminuida de los materiales de empaque no porosos es la disminución del área superficial de dichos soportes, ya que la mayor parte del área superficial en un soporte cromatográfico radica en los poros. Los materiales de empaque no porosos disponibles comercialmente son poliméricos o de sílica, con funcionalidad para fase inversa, intercambio iónico o afinidad.

Los materiales de empaque de perfusión^{ref(223)} (de PerSeptive Biosystems), que tienen una mayor capacidad que los no porosos, consisten en un núcleo de PS-DVB y una capa de un copolímero hidrofílico unida al soporte de PS-DVB y a la fase estacionaria. El soporte contiene 2 tipos de poros; poros perfusivos de diámetro entre 600 y 800 nm, y una familia de poros más pequeños de 50 a 150 nm de diámetro. El transporte del compuesto analizado ocurre por convección en los poros difusivos (los poros son suficientemente grandes que la fase móvil realmente fluya a través de esos poros) y por difusión en los poros pequeños. La alta capacidad de los materiales de empaque de perfusión (en comparación con la de los no porosos) resulta del aumento del área superficial creado por los poros pequeños, en los que el compuesto analizado se retiene. Las altas eficiencias de estos soportes en la cromatografía de



macromoléculas pueden ser explicadas por el hecho que los poros de 50 a 150 nm de diámetro generalmente miden 1 mm o menos de longitud, limitando el espacio de que dispone el compuesto analizado para difundir en los poros. Se han desarrollado materiales de empaque de perfusión para cromatografía de fase inversa y normal, intercambio iónico y afinidad.

Instrumentación

Como se mencionó previamente, la HPLC moderna requiere instrumentación relativamente sofisticada para lograr separaciones en menos de 10 minutos. Hay cuatro componentes básicos en el sistema de separación: (1) un sistema dispensador de solvente que controla el flujo de fase móvil, (2) un sistema de introducción de la muestra, (3) la columna, y (3) el detector (Fig. 6-1). Además, para mostrar o calcular los resultados, se utiliza un registrador o integrador, a menudo equipado con adquisición de datos computarizada. La operación detallada, mantenimiento y problemas de todos los componentes de un sistema de HPLC pueden consultarse en libros especializados.[ref\(224\)](#)

Sistemas dispensadores de solvente

El sistema dispensador de solvente más común se basa en la bomba de pistón recíproca. Otros tipos como las bombas de diafragma y de amplificación neumática, son de interés histórico.

En las primeras bombas usadas en HPLC, la dispensación de solvente ocurría en un intervalo menor que la mitad del ciclo. Esto significaba que el flujo a través de la columna era errático. El frenado del flujo y la compresión del solvente que ocurría cuando la cabeza de la bomba se llenaba también resultaba en una señal en el detector, lo que limitaba la detección del compuesto analizado. En la jerga cromatográfica, el frenado es conocido como “pulso”. Subsecuentemente, los fabricantes han usado una variedad de diseños para minimizar la pulsación, que van desde un llenado del cabezal muy rápido comparado con la dispensación, hasta 2 ó más bombas desfasadas de manera que un cabezal siempre esté dispensando solvente. También hay dispositivos mecánicos conocidos como “amortiguadores de pulsaciones” que trabajan bastante bien bajo condiciones isocráticas. Debe enfatizarse, sin embargo, que aunque los pulsos pueden ser minimizados en una bomba recíproca de pistón, nunca pueden ser eliminados. Las bombas jeringa son más convenientes en las aplicaciones sensibles a las pulsaciones, como cuando se usa un detector electroquímico, o cuando se trabaja a flujos muy bajos ($\mu\text{L}/\text{min}$ en columnas de pequeño diámetro).

La elución en gradiente se logra cuando los solventes se mezclan antes o después de pasar por las bombas. Un sistema de cualquier tipo en buenas condiciones de mantenimiento puede funcionar bien, y la selección de uno u otro deberá basarse en la reproducibilidad de los gradientes, perfiles de gradiente que pueden lograrse, costo y preferencia del operador.

Sistemas de introducción de la muestra

El método más ampliamente usado para introducir una muestra en el sistema cromatográfico es la válvula de inyección de rulo fijo. Una alícuota de la muestra se carga en un rulo externo de la manguera de acero inoxidable. Luego se gira la válvula de manera que la muestra en el rulo es llevada hacia la columna por la fase móvil impulsada por la bomba. El



retorno de la válvula a su posición original permite la carga de la muestra siguiente. Las válvulas de rulo fijo pueden ser usadas de dos maneras: llenado parcial y llenado total. En este último método el rulo entero (ejemplo: 20 μL) se llena con la muestra y se inyecta. Este es el método más preciso. Debe reconocerse, sin embargo, que la obtención de resultados exactos requiere llenar el rulo con 5 a 10 volúmenes del rulo. En el modo de llenado parcial, el rulo no se llena totalmente con muestra. En este caso, la precisión del volumen inyectado está determinada por la jeringa utilizada.

Además de la válvula inyectora manual descripta, existen numerosos dispositivos de inyección automática. Estos automuestreadores permiten la operación del sistema de HPLC en ausencia de personal, haciendo posible su uso durante las 24 horas del día. Estos automuestreadores permiten el funcionamiento del equipo de HPLC sin operador, haciendo posible su uso durante las 24 horas. Normalmente son bastante confiables y precisos por sus avances mecánicos y de computación. Estos dispositivos pueden costar 5,000 a 10,000 dólares, pero son importantes en laboratorios donde se procesan grandes cantidades de muestras.

Columnas y conectores

La columna es, por supuesto, la parte más importante del sistema de separación. El material de empaque para columnas ha sido discutido detalladamente. La columna de HPLC normal tiene un diámetro interno de 4.1 o 4.6 mm y una longitud de 100 a 250 mm. Se requieren conectores en ambos extremos para conectar la columna a los otros componentes del sistema y para mantener el material de empaque dentro de la misma. Los fritados que se usan para retener el material de empaque deben tener poros de diámetro menor que $\frac{1}{4}$ del diámetro promedio del material de empaque. Además de la columna analítica (o preparativa), que es la que realmente realiza la separación, pueden ser usados dos tipos de columnas protectoras. *El guardacolumna* (Fig. 6-1) se coloca entre el inyector y la columna analítica y tiene un volumen $\frac{1}{15}$ a $\frac{1}{25}$ del correspondiente a la misma. Está empacado con un material similar al de la columna analítica. Su función es retener cualquier material particulado o cualquier componente de la muestra que se retenga irreversiblemente, y por lo tanto protege la columna analítica, que es costosa. La *precolumna* se coloca entre la bomba y el inyector. El material de empaque siempre es sílica, porque se usa para saturar la fase móvil con silicato y de esa manera evitar la disolución del material de empaque de la columna analítica. El uso de la precolumna permite operar columnas de sílica hasta pH 10, mucho más alcalino que el pH normal de disolución de la sílica.

La columna analítica ya ha sido descripta. Las altas eficiencias obtenidas con columnas de HPLC normales resultan del uso de partículas pequeñas (3, 5, ó 10 μm) totalmente porosas. Para obtener columnas eficientes y presiones de operación razonables, el rango entre la partícula más pequeña y la más grande debe ser lo más pequeño posible. Hay partículas esféricas e irregulares. Las columnas empacadas con partículas esféricas parecen dar menores presiones de operación y son más durables.

Las columnas “microapertura” (diámetro interno = 1 mm) y “apertura pequeña” (diámetro interno = 2 mm) permiten aumentar la sensibilidad (como se describió previamente) y ahorrar fase móvil en comparación con las columnas de HPLC convencionales, lo cual es conveniente por razones de costo, ambientales, y de compatibilidad con los detectores. Con



respecto a este último punto, para la detección por espectrometría de masas se usan columnas de tipo de “microapertura” porque los espectrómetros de masa requieren de la menor cantidad posible de fase móvil, y las columnas de “microapertura” introducen en el detector menores cantidades de fase móvil que los diseños convencionales.

Además de las columnas, las conexiones entre los componentes del sistema son críticas ya que los conectores deben introducir el menor ensanchamiento de picos posible. Deben ser de volumen muerto cero o por lo menos del tipo de menor volumen muerto. Se puede consultar un excelente artículo sobre la complejidad del sistema de conexiones en HPLC.[ref\(225\)](#)

Sistemas de detección

El componente final en el sistema cromatográfico es responsable de la detección de los compuestos a medida que eluyen de la columna. Idealmente un detector debería responder a cualquier compuesto, debería detectar picogramos o menos de los compuestos analizados, debería ser inmune a fenómenos relacionados al solvente, y debería responder linealmente en un rango amplio de concentraciones. Desafortunadamente, la cromatografía de líquidos no dispone de tal detector. Los tres tipos de detector usados rutinariamente en el laboratorio clínico son el de absorbancia, el de fluorescencia y el electroquímico. La detección por espectrometría de masas es importante en investigación clínica. La selección del detector apropiado dependerá de la selectividad y sensibilidad que se requieran. Han sido publicados varios libros que describen detalladamente los diferentes métodos de detección.[refs\(226\)](#) Aunque no se tratan en este libro, los métodos de derivatización, son medios importantes para aumentar la sensibilidad o la especificidad de la detección en los análisis por HPLC.[ref\(227\)](#) Las características y desempeño de los detectores comunes en cromatografía de líquidos se resumen en la Tabla 6-7.

Detección por absorbancia.

El modo de detección más frecuentemente usado en HPLC es la espectrofotometría de absorbancia. La ventaja de los detectores de absorbancia sobre los de fluorescencia o los electroquímicos es que pueden ser usados para detectar una mayor variedad de compuestos. Sin embargo, los detectores de absorbancia tienen límites de detección 10 y 100 veces más bajos que los de fluorescencia y que los electroquímicos, respectivamente. Para los detectores de absorbancia se requieren longitudes de onda mayores de 200 nm, ya que los solventes de las fases móviles absorben en forma apreciable en la región del espectro correspondiente al ultravioleta lejano (<200 nm). En general, el número de compuestos que puede ser detectado aumenta a medida que la longitud de onda disminuye. Sin embargo, a longitudes de onda bajas, también aumenta la detección de compuestos interferentes y se usa un aumento en los desplazamientos de la línea basal cuando se trabaja con gradientes. Entonces, es deseable usar la más alta longitud de onda a la cual el compuesto absorbe para incrementar la especificidad de la técnica.

Hay tres tipos de detectores de absorbancia: de longitud de onda fija, de longitud de onda variable, y de longitud de onda múltiple. Estos detectores, como se describe más adelante, difieren en el número de longitudes de onda disponibles para el monitoreo y pueden ser utilizadas varias longitudes de onda simultáneamente.

Detectores de longitud de onda fija. Este detector es popular por su bajo costo. Los

detectores de longitud de onda fija están limitados en la elección de longitudes de onda que pueden ser usadas. La elección está determinada por la fuente de luz específica que se utiliza. Cada clase de lámpara de arco emite líneas espectrales específicas. En la Tabla 6-8 se muestran las longitudes de onda de varias lámparas. La lámpara de vapor de mercurio de baja presión es la más ampliamente usada, con una longitud de onda de 254 nm. Las lámparas de cadmio y zinc son utilizadas para longitudes de onda menores. Las lámparas de mercurio recubiertas de fósforo emiten diferentes longitudes de onda, aumentando el número de longitudes de onda disponibles para ser usadas.

Detectores de longitud de onda variable. Estos detectores son convenientes porque permiten una elección ilimitada de longitudes de onda visibles y ultravioletas, mediante el uso de una fuente de luz de espectro continuo y un monocromador. Sin embargo, estos detectores son más complejos y caros que los de longitud de onda fija. Para obtener luz de longitudes de onda ultravioleta y visible se utilizan lámparas de deuterio y tungsteno respectivamente. Algunos detectores usan una fuente de deuterio tanto para la región ultravioleta como para la visible; sin embargo, estos detectores tienen menor precisión en el rango visible en comparación con los detectores que poseen una fuente de luz de tungsteno.

Detectores de longitud de onda múltiple. Éstos son detectores de longitud de onda variable que tienen la capacidad de monitorear varias longitudes de onda simultáneamente. Esta clase incluye detectores que difieren mucho en complejidad y sofisticación, desde los de doble canal, en los que pueden ser monitoreadas simultáneamente dos longitudes de onda, hasta aquéllos que pueden registrar un espectro entero en fracciones de segundo. Todos los detectores de longitud de onda múltiple (doble canal, registro de espectros) son convenientes por varias razones. Una de ellas es la optimización de la detección del compuesto analizado, ya que el detector permite el monitoreo de cada sustancia a la longitud de onda particular en la que la relación de respuesta compuesto analizado/interferente es máxima. Otra razón, es que el detector de longitud de onda múltiple puede ser usado para verificar la pureza de los picos. Aquellos detectores capaces de obtener espectros en forma ultrarrápida pueden ser también útiles para la identificación de compuestos y para la supresión de picos interferentes conocidos. Ha sido descrito el uso del detector de arreglo de diodos con estos propósitos.[ref\(228\)](#)

Hay dos tipos de detectores de longitud de onda múltiple capaces de obtener espectros de absorción en forma ultrarrápida: el de arreglo de diodos (“Photo Diode Array” o “PDA, en inglés) y un espectrofotómetro de exploración ultrarrápida conocido como detector de barrido de baja inercia (“Low-Inertia Scanning” o “LIS”, en inglés). Los detectores de PDA emplean un esquema de óptica invertida (lo que significa que la red de difracción es colocada después de la celda de muestra y no antes de ella), en los cuales el espectro completo de luz (normalmente se usa una lámpara de deuterio como fuente) es dirigido a través de la celda de flujo a una red de difracción, la cual dispersa la luz en sus diversos componentes de diferentes longitudes de onda. Las longitudes de onda dispersadas son dirigidas a un ordenamiento consistente de 32 a 512 diodos (los PDAs con mayor resolución son los que poseen mayor número de diodos). Cuando la luz llega a un diodo, produce una corriente proporcional a la intensidad de la luz. Como la luz que llega al arreglo de diodos es dispersada espacialmente de acuerdo a su longitud de onda, cada diodo tiene un rango particular de longitudes de onda que lo impacta, y entonces el detector registra simultáneamente el espectro completo. Los PDAs más rápidos pueden registrar un espectro cada 10 mseg (según las especificaciones de



una compañía representativa la velocidad de adquisición de espectros es de 12.5 mseg para un rango de longitudes de onda de 190 a 600 nm, con un ancho de banda de 4 nm y un nivel de ruido durante el barrido de menos de $\pm 2.5 \times 10^{-5}$ AU, a 254 nm).

El detector LIS emplea el diseño óptico normal. Se han hecho modificaciones a estos detectores para permitir el barrido rápido de longitudes de onda. Para los rangos ultravioleta y visible se usan las lámparas de deuterio y tungsteno, respectivamente. El detector LIS tiene un rango de espectro limitado, por lo que se requiere seleccionar la lámpara de deuterio o la de tungsteno para obtener rangos de longitudes de onda de 190 a 365 nm o de 366 a 800 nm. El detector LIS también tiene una velocidad lenta de barrido de 583 ms para cubrir el rango de 190 a 365 nm en intervalos de 3 nm, con un paso de banda de 2.7 nm. Debe tenerse en cuenta, sin embargo, que la velocidad de adquisición del espectro para el detector LIS es suficiente para la mayor parte del trabajo en HPLC. Sólo aquellas técnicas de HPLC que dan picos extremadamente angostos requieren velocidades rápidas de barrido. Una ventaja importante del detector LIS es que tiene menos interferencias por ruido que el detector PDA ($\pm 1 \times 10^{-5}$ AU [durante un barrido a 254 nm]). Esto resulta en mejores límites de detección para el LIS por lo menos en un factor de 2.5. Debe notarse que la ganancia en límite de detección es mucho mayor en la región visible del espectro, ya que el LIS utiliza una lámpara de tungsteno para la región visible, mientras que el PDA normalmente emplea sólo una lámpara de deuterio.

Detección de fluorescencia.

La técnica de fluorescencia se basa en la capacidad de una molécula para emitir luz después que ha sido excitada por radiación luminosa. Para una descripción de la espectroscopía de fluorescencia, favor de referirse al Capítulo 4. Las principales diferencias en el desempeño de los fluorómetros de distintos fabricantes provienen de diferencias en la intensidad de la lámpara y de la eficiencia de la detección. Los instrumentos disponibles comercialmente usan emisión de lámparas de arco de deuterio o xenón para la excitación. Debido a que la intensidad de la fluorescencia es directamente proporcional a la intensidad de la luz de excitación, las fuentes de rayos láser han despertado gran interés. La fluorescencia es un método de detección muy sensible para aquellos compuestos que fluorescen, pero como muchas moléculas no fluorescen, se han desarrollado numerosos métodos para la obtención de derivados. La epinefrina y otros compuestos aminados pueden reaccionar con cloruro de dimetilaminonaftalenesulfonilo (dansil) u o-ftalaldehído para producir compuestos altamente fluorescentes.

Detección electroquímica. [ref\(229\)](#)

Para un grupo selecto de compuestos, la detección electroquímica es el método de elección por su mejor límite de detección (femtomoles a picomoles). Los tipos de compuestos que pueden ser determinados por cromatografía de líquidos mediante detección electroquímica ("Liquid Chromatography-Electrochemical Detection" o "LCEC", en inglés) son los que sufren reacciones de transferencia reversible de electrones. Para una detección sensible y selectiva se requiere de un pequeño potencial de oxidación (o reducción) y una cinética rápida. Las clases de compuestos orgánicos que tienen estas características son los fenoles (como hidroquinonas, catecoles y catecolaminas), aminas aromáticas, tioles, nitrocompuestos y quinonas. Los compuestos como aldehídos y cetonas requieren un potencial de reducción demasiado alto,



mientras que las alquilaminas y los ácidos carboxílicos requieren potenciales de oxidación demasiado altos para su determinación directa por LCEC. Los compuestos altamente conjugados como las cetonas α,β -insaturadas y las iminas pueden ser determinadas por LCEC, aunque las técnicas de detección UV son mejores. Los análisis más comunes por LCEC realizados en el laboratorio clínico, en los cuales la técnica de LCEC tiene una ventaja decisiva por su capacidad para detectar pequeñas cantidades de sustancias, son la determinación de catecolaminas, metabolitos de catecolaminas, serotonina y ácido 5-hidroxiindol acético.

Detección amperométrica y coulométrica. En general, la detección electroquímica de un compuesto ocurre a través de una transferencia de electrones entre la superficie del electrodo y el compuesto analizado, con subsecuente medición de la corriente. La fuerza oxidante de la superficie del electrodo (potencial positivo incrementado por una mayor capacidad oxidante), o fuerza reductora de la superficie del electrodo (potencial negativo incrementado por una mayor capacidad reductora), es determinada por el potencial aplicado. Entonces, el potencial establece la selectividad del detector. La operación a bajos potenciales de oxidación (o potenciales de reducción menos negativos) proporciona una gran selectividad. El nombre de la técnica de detección antes descrita es *amperometría de potencial controlado*. En esta técnica, las celdas del detector se componen de 3 electrodos: un electrodo de trabajo (en el que ocurre la reacción redox), un electrodo de referencia, y un electrodo auxiliar. El potencial se aplica entre los electrodos de referencia y de trabajo, y la corriente pasa entre el electrodo auxiliar y el de trabajo.

Los detectores se clasifican como *amperométricos*, en los que 1% a 10% del compuesto analizado reacciona en el electrodo, o *coulométricos*, en los que reacciona el 100% de dicha sustancia. Aumentando la superficie del electrodo o disminuyendo el flujo para incrementar el porcentaje de electroconversión no se aumentan los límites de detección, porque hay un incremento concomitante en la electrólisis de fondo y por lo tanto del ruido. Por lo tanto, los detectores coulométricos no tienen un mejor límite de detección que los amperométricos. Algunos factores como las variaciones de temperatura, flujo e impurezas en la fase móvil, que contribuyen en forma importante al ruido, necesitan ser controlados para lograr los más bajos límites de detección. Por esta razón normalmente no se emplean gradientes en LCEC. Se utilizan tres diseños de detectores amperométricos, que se pueden ver en la Fig. 6-10: capa fina, de flujo en la pared (“wall jet”, en inglés) y tubular. Los electrodos amperométricos más comunes son los de capa fina, en los que el efluente de la columna pasa a través de un canal plano de volumen muy pequeño ($<1 \mu\text{L}$), en el que electrodo de trabajo está ubicado a un lado del canal y los de referencia y de lectura están ubicados del otro lado. El detector coulométrico está hecho de un material poroso a través del que pasa la fase móvil, proporcionando la gran superficie requerida para la conversión completa del compuesto analizado. Debe tenerse en cuenta que para la detección electroquímica se requiere una fase móvil conductora, normalmente con una concentración de electrolito o buffer de 0.01 a 0.1 M.

La mejor elección del material para la superficie activa del electrodo depende del compuesto a ser medido y de las condiciones del análisis. El electrodo de carbón vidriado es el más utilizado por su amplio rango de potencial (de +1.2 a -0.8 V contra Ag/AgCl), su estabilidad mecánica a altos flujos y su estabilidad química frente a solventes no acuosos. Para sustancias que requieren altos potenciales de reducción se usa una capa de mercurio sobre oro

(+0.2 a -1.2 V contra Ag/AgCl). Los electrodos de mercurio son usados para la determinación de tioles, ya que la asociación de un tiol al mercurio disminuye el potencial de oxidación del mercurio acomplejado hasta +0.1 V.

Para reacciones catódicas, los problemas asociados con la reducción del oxígeno restringen el límite de detección al nivel de los nanogramos. Para que el modo reductivo resulte más sensible, es necesario eliminar todo el oxígeno de la fase móvil.

Detección amperométrica pulsante (PAD).^{ref(230)} A comienzos de la década del 80 ocurrió un desarrollo significativo en los detectores electroquímicos que permitió una detección sensible de los carbohidratos. Antes, era necesaria una derivatización de los carbohidratos con reactivos fluoróforos o cromóforos para lograr una detección sensible. La detección se realizaba mediante el uso de electrodos hechos de metales nobles como el platino o el oro, que catalizan las reacciones de oxidación de los carbohidratos, reacciones que no ocurren a potenciales razonables cuando se usan electrodos de otros materiales. Los electrodos hechos con metales nobles, sin embargo, presentan problemas particulares que resultan de la formación de óxidos metálicos a potenciales positivos, y la adsorción irreversible de compuestos sobre su superficie. Estos problemas fueron resueltos mediante el desarrollo de un esquema de onda de triple pulso. El término *detección amperométrica pulsante* (“Pulsed Amperometric Detection” o “PAD”, en inglés) se refiere a la técnica de detección electroquímica que usa esta forma de onda de triple pulso sobre electrodos de platino o de oro. En esta técnica, se aplica un ciclo de 3 potenciales en un período de 600 a 1000 milisegundos. Estos potenciales, que son necesarios para el proceso analítico, son: (1) un potencial de reducción, al cual se reducen los óxidos metálicos sobre la superficie del electrodo y el compuesto analizado se adsorbe; (2) un potencial de oxidación, al cual se mide el compuesto analizado (la corriente resultante de la oxidación de los átomos de hidrógeno que fueron eliminados catalíticamente por la superficie del metal); y (3) un potencial de oxidación aún mayor, al cual se remueven las moléculas previamente adsorbidas sobre la superficie del electrodo. Mediante esta técnica han sido determinados, además de carbohidratos, aminoácidos y alcoholes.

Detección por conductividad. Además de las técnicas de LCEC previamente descriptas, la medición de la conductividad es también considerada un método de detección electroquímico. La determinación por HPLC de aniones inorgánicos utiliza cromatografía de intercambio iónico con detección por conductividad. La conductividad es una medida de conductancia, donde se aplica un potencial alternado constante a la superficie de un electrodo de platino. La cantidad de corriente generada aumenta con la conductancia de la solución. La corriente en estos electrodos es dependiente de la temperatura, y por lo tanto la temperatura debe ser rigurosamente controlada.

Detección por espectrometría de masas.^{refs(231)}

El uso de la espectrometría de masas en la detección en cromatografía de líquidos está en continuo aumento debido a su capacidad única para identificar compuestos mediante la información de sus pesos moleculares y sus características de fragmentación. Las interfases comprenden atomización térmica o “termospray”, inyección líquida directa, bombardeo atómico rápido con flujo continuo, y métodos de ionización a presión atmosférica como el “electrospray”. La interfase de termospray es la más usada en el ámbito clínico, ya que es útil para la determinación de compuestos moderadamente polares en el rango de masa de 200 a 330



1000 daltones. Sin embargo, esta técnica requiere que el compuesto tenga alguna volatilidad. La de bombardeo atómico rápido con flujo continuo es útil para determinar compuestos no volátiles hasta un peso molecular de 6000. La técnica de electrospray es útil para la determinación de compuestos polares e iónicos y tiene la característica distintiva de ser capaz de analizar macromoléculas con pesos moleculares de hasta 100,000 daltones. Para una discusión más detallada sobre espectrometría de masas ver el Capítulo 8.

Aplicaciones

Han sido publicados numerosos libros sobre HPLC de compuestos clínicos y bioquímicos. [refs\(232\)](#) La Tabla 6-9 contiene una lista de los compuestos clínicamente relevantes en los que la HPLC juega un papel importante para su análisis. Las modalidades de HPLC mostrados en la Tabla 6-9 para cada clase de compuestos son las formas que se usan predominantemente (según una encuesta reciente).

Referencias

1. Snyder LR, Kirkland JJ: *Introduction to modern liquid chromatography*, ed 2, New York, 1979, Wiley & Sons.
2. Scott RPW: *Liquid chromatography column theory*, Chichester, 1992, Wiley & Sons.
3. Karger BL, Snyder LR, Horvath C: *An introduction to separation science*, New York, 1973, Wiley & Sons.
4. Giddings JC: *Dynamics of chromatography*, New York, 1965, Marcel Dekker.
5. Guichon GG: In Horvath C, editor: *High performance liquid chromatography: advances and perspectives*, vol 2, New York, 1981, Academic Press.
6. van der Wal SJ, Snyder LR: Precision of 'high-performance' liquid-chromatographic assays with sample pretreatment: error analysis for the Technicon 'Fast-LC' system, *Clin Chem* 27:1233-1240, 1981.
7. Ghrist BFD, Cooperman BS, Snyder LR: Design of optimized high-performance liquid chromatographic gradients for the separation of either small or large molecules. I. Minimizing errors in computer simulations, *J Chromatogr* 459:1-23, 1988.
8. Ghrist BFD, Snyder LR: Design of optimized high-performance liquid chromatographic gradients for the separation of either small or large molecules. II. Background and theory, *J Chromatogr* 459:25-41, 1988.
9. Ghrist BFD, Snyder LR: Design of optimized high-performance liquid chromatographic gradients for the separation of either small or large molecules. III. An overall strategy and its application to several examples, *J Chromatogr* 459:43-63, 1988.
10. Snyder LR: *Principles of adsorption chromatography*, New York, 1963, Marcel Dekker.
11. Snyder LR, Glajch JL, Kirkland JJ: Theoretical basis for a systematic optimization of mobile phase selectivity in liquid-solid chromatography, *J Chromatogr* 218:299-326, 1981.
12. Majors RE: Trends in HPLC column usage, *LCGC* 9:686-693, 1991.
13. Dorsey JG, Dill KA: The molecular mechanism of retention in reversed-phase liquid chromatography, *Chem Rev* 89:331-346, 1989.
14. Szepesi G: *How to use reverse-phase HPLC*, New York, 1992, VCH.
15. Karger BL, LePage JN, Tanaka N: Secondary chemical equilibria in high-performance liquid chromatography. In Horvath C, editor: *High performance liquid chromatography: advances and perspectives*, vol 1, New York, 1980, Academic Press.
16. Turkova J: *Bioaffinity chromatography*, ed 2, Amsterdam, 1993, Elsevier.
17. Scouten WH: *Affinity chromatography: bioselective adsorption on inert matrices*, St. Louis, 1992, Sigma-



- Aldrich Co.
18. Allenmark S: *Chromatographic enantioseparation: methods and applications*, ed 2, New York, 1991, Ellis Horwood.
 19. Krstulovic AM: *Chiral separations by HPLC*, Chichester, 1989, Ellis Horwood.
 20. Unger KK, editor: *Packings and stationary phases in chromatographic analysis*, New York, 1990, Marcel Dekker.
 21. Anderson DJ: High-performance liquid chromatography (advances in packing materials), *Anal Chem* 67:475R-486R, 1995.
 22. Mikes O, Coupek J: Organic supports. In Gooding KM, Regnier FE, editors: *HPLC of biological macromolecules*, New York, 1990, Marcel Dekker, pp 25-46.
 23. Tanaka N, Araki M: Polymer-based packing materials for reversed-phase chromatography, *Adv Chromatogr* 30:81-122, 1989.
 24. Anderson DJ: High-performance liquid chromatography (direct injection techniques), *Anal Chem* 65:434R-443R, 1993.
 25. Afeyan NB, Fulton SP, Regnier FE: Perfusion chromatography packing materials, *J Chromatogr* 544:267-279, 1991.
 26. Dolan JW, Snyder LR: *Troubleshooting LC systems: a comprehensive approach to troubleshooting LC equipment and separations*, Clifton, N.J., 1989, Humana Press.
 27. Dolan J, Upchurch P: *Interchangeability of HPLC fittings*, Oak Harbor, Wash., 1983, Upchurch Scientific; also *LC* 2:20-21, 1984, and 3:92-95, 1985.
 28. Parriott D, editor: *A practical guide to HPLC detection*, San Diego, 1993, Academic Press.
 29. Yeung ES, editor: *Detectors for liquid chromatography*, New York, 1986, Wiley & Sons.
 30. Lingeman H, Underberg WJM, editors: *Detection-oriented derivatization techniques in liquid chromatography*, New York, 1990, Marcel Dekker.
 31. Anderson DJ: High-performance liquid chromatography, *Anal Chem* 63:213R-219R, 262R-264R, 1991.
 32. Johnson DC, LaCourse WR: Liquid chromatography with pulsed electrochemical detection at gold and platinum electrodes, *Anal Chem* 62:589A-597A, 1990.
 33. Niessen WMA, van der Greef J: *Liquid chromatography-mass spectrometry: principles and applications*, New York, 1992, Marcel Dekker.
 34. Heftmann E, editor: *Chromatography: fundamentals and applications of chromatography and related differential migration methods, part B: Applications*, ed 5, Amsterdam, 1992, Elsevier.
 35. Hanai T, editor: *Liquid chromatography in biomedical analysis*, Amsterdam, 1991, Elsevier.
 36. Papadoyannis In: *HPLC in clinical chemistry*, New York, 1990, Marcel Dekker.
 37. Hearn MTW, editor: *HPLC of proteins, peptides and polynucleotides, contemporary topics and applications*, New York, 1991, VCH.
 38. Gooding KM, Regnier FE, editors: *HPLC of biological macromolecules*, New York, 1990, Marcel Dekker.
 39. Fallon A, Booth RFG, Bell LD, editors: *Applications of HPLC in biochemistry*, Amsterdam, 1987, Elsevier.
 40. Lim CK, editor: *HPLC of small molecules*, Oxford, U.K., 1986, IRL Press (Oxford University Press).
 41. Henschen A, Hupe KP, Lottspeich F, Voelter W, editors: *High performance liquid chromatography in biochemistry*, Weinheim, Federal Republic of Germany, 1985, VCH.

Tablas

Tabla 6-1. Efecto de la resolución sobre diferentes parámetros de los picos *



Resolución	Pureza§	% error en el área‡	% error en la altura del pico‡
0.6	90	>-25	~15
0.8	95	-10	1
1.0	98	-3	<1
1.25	99.5	<-1	0
1.5	100	0	0

* Suponiendo una relación de altura de picos de 1 a 1 para los 2 componentes.
§ Pureza del pico principal, suponiendo que la colecta se detiene en el punto más bajo del valle entre los picos.
‡ Error para el pico más pequeño.

Tabla 6-2. Amortiguadores útiles para cromatografía líquida de alta eficacia de fase inversa

Amortiguador	pK _a
Acido fosfórico/fosfato diácido	2.12
Acido cloroacético/cloroacetato	2.87
Acido succínico/succinato monoácido	4.23
Acido acético/acetato	4.77
Fosfato de piperazina	5.33
Succinato monoácido/succinato	5.65
Fosfato de tetrametiletilendiamina	6.13
Fosfato diácido/fosfato monoácido	7.20
Tris(hidroximetil)aminometano	8.19

Tabla 6-3. Pares bioquímicos usados en cromatografía de afinidad

Ligando de afinidad	Componente complementario
Inhibidores, cofactores, análogos del sustrato	Enzimas
Inmunoglobulinas	Antígenos, haptenos
Receptores	Hormonas
Ácidos nucleicos	Ácidos nucleicos complementarios
Polinucleótidos	Proteínas de unión
Lectinas	Carbohidratos, glicoproteínas
Acido <i>m</i> -aminofenilborónico	Compuestos que contienen Cis-diol (carbohidratos, ácidos nucleicos, catecolaminas, glucoproteínas)
Proteína A, proteína G	Immunoglobulina G



Heparina	Proteínas de la coagulación
Colorantes triazínicos	Diferentes proteínas y enzimas
Quelantes de metales	Proteínas, péptidos, ácidos nucleicos

Tabla 6-4. HPLC de fase inversa: información general y materiales de empaque

Modo	Fase inversa
Información general	
Compuestos determinados	Compuestos de polaridad baja e intermedia
Comentarios	Modo cromatográfico más utilizado en análisis clínicos Para compuestos iónicos o ionizables se requiere supresión o apareamiento de iones por la fase móvil
Materiales de empaque disponibles comercialmente	
Fase unida	<i>n</i> -Octadecilo (C18), <i>n</i> -octilo (C8) (Fases más utilizadas en análisis clínicos) <i>n</i> -Butilo (C4) (Fase preferida para separaciones de proteínas; sin embargo, menos estable que C8, C18 en fases móviles acídicas como TFA) Fenilo (Preferida para compuestos que contienen uno o más grupos aromáticos) (Estos grupos funcionales pueden estar unidos a los siguientes soportes: sílica, polibutadieno modificado/ PHAM/alúmina, PS-DVB, PVA)
Polímero recubierto	Sílica modificada con alquilpolisiloxanos, alquil silanos multifuncionales, alquil PVA Alúmina modificada con polibutadieno (con o sin grupos alquilo unidos)
Soporte base (nativo)	PS-DVB PAM Grafito poroso
No poroso	PS-DVB (nativo), PHAM sílica (fase inversa)
Perfusión	PS-DVB (nativo y C18) (de PerSeptive Biosystems) Medios de fase inversa de acceso restringido a la superficie interna (ISRP) (de Regis Chemical) (Glicina-L-fenilalanina-L-fenilalanina [GFF] funcionalidades)
Medios de acceso restringido	Superficie semipermeable (SPS) (de Regis Chemical) (C8, C18, y funcionalidades de fenilo) Fase hidrofóbica protegida (SHP) (de Supelco) (Funcionalidad de fenilo)
<i>PS-DVB</i> , Poli (estirenometil divinilbenceno); <i>PAM</i> , poli(alquilmethylacrilato); <i>PHAM</i> , poli(hidroxialquil metacrilato o acrilato); <i>PVA</i> , alcohol polivinílico; <i>TFA</i> , ácido	

trifluoroacético.

Tabla 6-5. HPLC de intercambio iónico: información general y materiales de empaque.

Intercambio iónico		
Modo	Aniónico	Catiónico
Información general		
Compuestos determinados	Compuestos cargados negativamente, compuestos ácidos, proteínas con pI <8	Compuestos cargados positivamente, compuestos básicos, proteínas con pI >6
Comentarios	La carga de la fase estacionaria variará con el pH de la fase móvil (cerca del pKa del grupo funcional del soporte) para intercambiadores iónicos débiles pero no para los fuertes	
Materiales de empaque disponibles comercialmente		
Fase unida	<i>Débiles</i> Aminas primarias, secundarias y terciarias (—NR ₂ , —NHR, —NH ₂) (Bases débiles con pKa = 5-9; la más utilizada es DEAE ([—O—CH ₂ —CH ₂ —N—(C ₂ H ₅) ₂]) <i>Fuertes</i> Aminas cuaternarias [—NR ₃ ⁺] [Bases fuertes con pKa >13) (Los grupos funcionales mencionados pueden ser unidos a sílica, PS-DVB, and PHAM)	<i>Débiles</i> Acidos carboxílicos [—COO ⁻] (Acidos débiles con pKa = 4 - 6; la más utilizada es CM ([—CH ₂ —COO ⁻]) <i>Fuertes</i> Acido sulfónico [—SO ₃ ⁻] (Ácidos fuertes con pKa <1) Intermedios Sulfoalquilo [—(CH ₂) _n —SO ₃ ⁻] (los más utilizados son SE y SP [pKa para SP = 2.3]) (Los grupos funcionales mencionados pueden ser unidos a sílica, PS-DVB, y PHAM)
Polímero recubierto	<i>Débiles</i> Soportes recubiertos con polietilenimina (PEI) (sílica y PS-DVB) <i>Fuertes</i> Látex con un grupos funcionales amina cuaternaria sobre poli(etilvinil-divinilbenceno) o PS-DVB	<i>Débiles</i> Látex con un grupos funcionales ácido carboxílico sobre poli(etilvinil-divinilbenceno) o PS-DVB Copolímero polibutadieno-ácido maleico sobre sílica
Soporte base (nativo)	Ninguno	Ninguno
No poroso	PHAM (PEI, DEAE, y —NR ₃ ⁺), poli(dimetilaminopropilmetacrilamida (dimetilaminopropil)	PHAM (carboxilo y SP), (SP), sílica (catión), sílica (anión),



Perfusión	PS-DB (DEAE, —NR ₃ ⁺)	PS-DVB (PEI y DEAE) PS-DVB (SE y CM)
Medios de acceso restringido	Ninguno	Ninguno
<i>PS-DVB</i> , poli(estireno-divinilbenceno); <i>PHAM</i> , poli(hidroxialquil metacrilato o acrilato); <i>PVA</i> , alcohol polivinílico; <i>PEI</i> , polietilenimina. <i>DEAE</i> , dietilaminoetil; SE, sulfoetil; SP, sulfopropil.		

Tabla 6-6. HPLC en fase normal y de exclusión molecular: información general y materiales de empaque.

Modo	Fase normal	Exclusión molecular
Información general		
Compuestos determinados	Compuestos hidrofílicos (como azúcares; complementa la fase inversa, que no retiene los compuestos hidrofílicos) Isómeros (como esteroides) Separación de clases (A menudo antes de HPLC o inmunoanálisis se realiza una “limpieza” de la muestra por cromatografía de fase normal de baja performance)	Compuestos >1000 daltons
Comentarios	Fases normales unidas comparadas con la sílica y la alúmina: *Picos más angostos, sin coleado * Retención menos fuerte *Equilibrado más rápido con la fase móvil, lo que hace posible la cromatografía en gradiente	La SEC hidrofílica (todos los materiales de empaque que se listan más abajo excepto PS-DVB) se utiliza en análisis clínicos
Materiales de empaque disponibles comercialmente		
Fase unida	Diol [—(CH ₂) ₃ OCH ₂ CH(OH)CH ₂ (OH)] Ciano [—(CH ₂) ₃ CN] (también llamada nitrilo) Amino [—(CH ₂) _n NH ₂] (donde n = 3 ó 5) (Polaridad: amino > ciano > diol) Casi todos los soportes son de sílica, con unas pocas excepciones	Diol sobre sílica [—(CH ₂) ₃ OCH ₂ CH(OH)CH ₂ (OH)]
Polímero recubierto	Ninguno	Poliéter y PVA sobre sílica
Soporte base (nativo)	Sílica Alúmina Grafito poroso	PHAM, PVA, agarosa entrecruzada, PS-DVB
No poroso	Ninguno	No aplicable
Perfusión	PS-DVB (diol) (PerSeptive Biosystems)	Ninguno

Medios de acceso restringido	Superficie semipermeable (SPS) (Regis Chemical) (ciano)	No aplicable
<i>PS-DVB</i> , Poli(estireno-divinilbenceno); <i>PHAM</i> , poli(hidroxialquil metacrilato o acrilato); <i>PVA</i> , alcohol polivinílico; <i>SEC</i> , exclusión molecular.		

Tabla 6-7. Características de desempeño de detectores usados comúnmente.

Característica del detector ideal: Selectivo?	
Longitud de onda fija:	No
Longitud de onda variable:	No
Fluorescencia:	Sí
<u>Electroquímico:</u>	
Oxidación:	Sí
Reducción:	Sí
Característica del detector ideal: Sensibilidad a cambios en el flujo?	
Longitud de onda fija:	Posible
Longitud de onda variable:	Posible
Fluorescencia:	No
<u>Electroquímico:</u>	
Oxidación:	Sí
Reducción:	Sí
Característica del detector ideal: Límite de detección?	
Longitud de onda fija:	10^{-10} g/L
Longitud de onda variable:	10^{-9} g/L
Fluorescencia:	10^{-11} g/L
<u>Electroquímico:</u>	
Oxidación:	10^{-12} g/L
Reducción:	10^{-9} g/L
Característica del detector ideal: Volumen de la celda?	
Longitud de onda fija:	8-10 μ L
Longitud de onda variable:	8-10 μ L
Fluorescencia:	20 μ L
<u>Electroquímico:</u>	
Oxidación:	≤ 1 μ L
Característica del detector ideal: Compatible con gradiente?	
Longitud de onda fija:	Sí
Longitud de onda variable:	Sí
Fluorescencia:	Sí
<u>Electroquímico:</u>	
Oxidación:	No
Reducción:	No



Tabla 6-8. Longitudes de onda de emisión de las fuentes de arco usadas en detectores de longitud de onda fija.²⁹

Fuente	Mercurio	Fósforo mercurio	Cadmio	Zinc
Líneas de emisión (nm)	254 313 365 405 436 546 578	280 300 320 340 470 510 610 660	229 326	214 308

Tabla 6-9. Compuestos clínicamente importantes determinados por HPLC.

Compuesto		
Modo de HPLC más usado	Clase	Subclase
Aminoácidos		Fase inversa, intercambio iónico
Aniones	Oxalato, citrato, sulfato, fosfato, yoduro, bromuro, cloruro, tiocianato, nitrato, nitrito	Intercambio iónico
Acidos biliares		Fase inversa
Bilirrubinas		Fase inversa
Bioaminas	Catecolaminas y sus metabolitos Serotonina y sus metabolitos	Fase inversa, par iónico Fase inversa, par iónico
Carbohidratos	Monosacáridos y oligosacáridos	Fase inversa, intercambio iónico, partición moderada por iones, fase normal
Fármacos y sus metabolitos		Fase inversa
Acidos grasos y ácidos orgánicos	Ácidos grasos Ácidos orgánicos	Fase inversa Intercambio iónico, partición moderada por iones, fase inversa
Hemoglobinas	Glicohemoglobinas Variantes de hemoglobina	Intercambio iónico, afinidad Intercambio iónico
Isómeros de posición		Fase normal
Lipoproteínas		Exclusión molecular

Derivados de ácidos nucleicos	Bases, nucleósidos, nucleótidos Oligonucleótidos Fragmentos de restricción de DNA	Fase inversa, par iónico Fase inversa, intercambio iónico Fase inversa, intercambio iónico
Fosfolípidos		Fase normal
Porfirinas		Fase inversa
Prostaglandinas		Fase inversa
Esteroides		Fase inversa
Vitaminas	Biotinas, folatos, nicotinamidas, ácidos patogénicos, retinoides (vitamina A), riboflavinas, tiaminas, tocoferoles (vitamina E), vitamina B6, vitamina B12, vitamina C, vitamina D, vitamina K	Fase inversa

Figuras

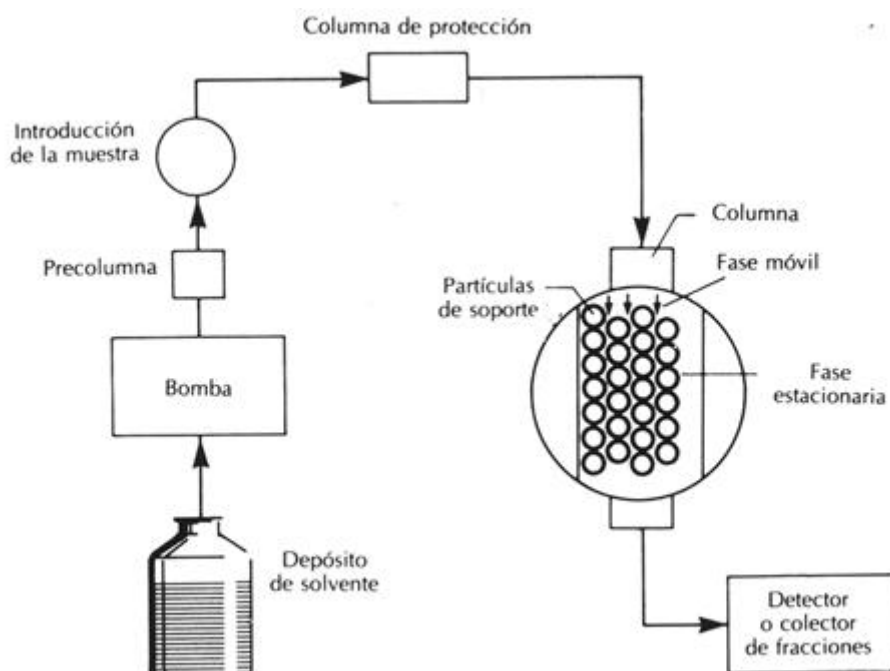


Figura 6-1 Diagrama esquemático de un sistema de cromatografía líquida con columna. (De: Bowers LD, Carr PW: *Quantitative aspects of HPLC workshop*, Minneapolis, 1983.)

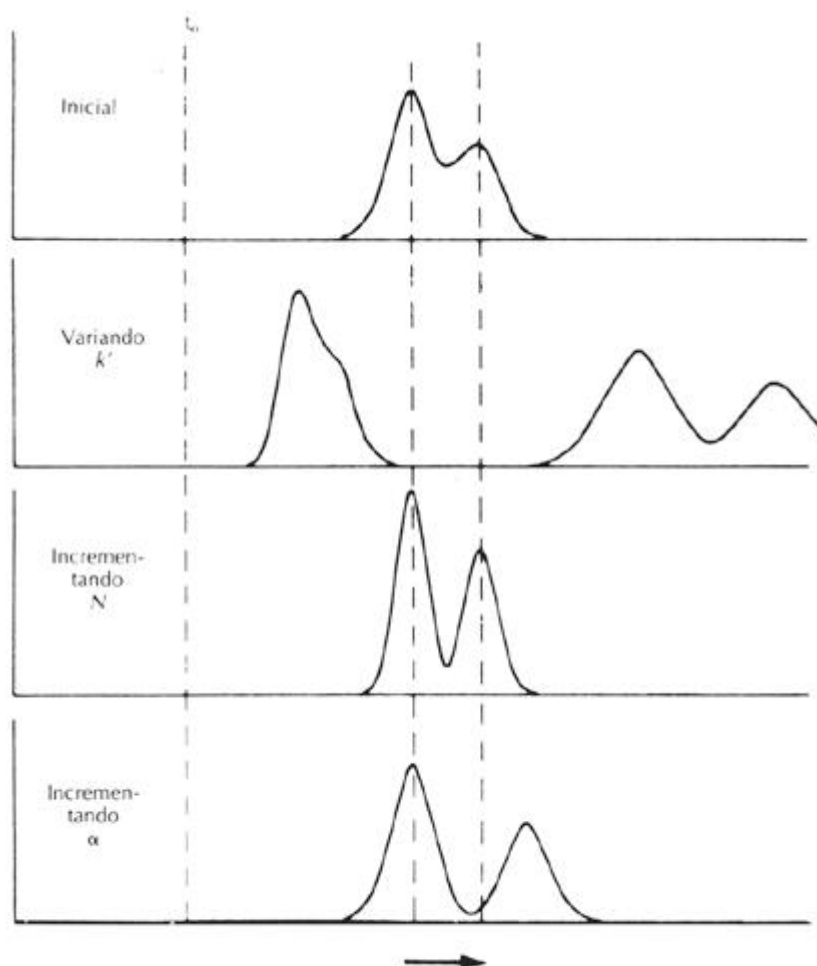


Figura 6-2 Efecto de la variación de k' , N , y α sobre la resolución. t , Tiempo. (De: Snyder LK, Kirkland JJ: *Introduction to modern liquid chromatography*, ed 2, New York, 1979, Wiley & Sons.)

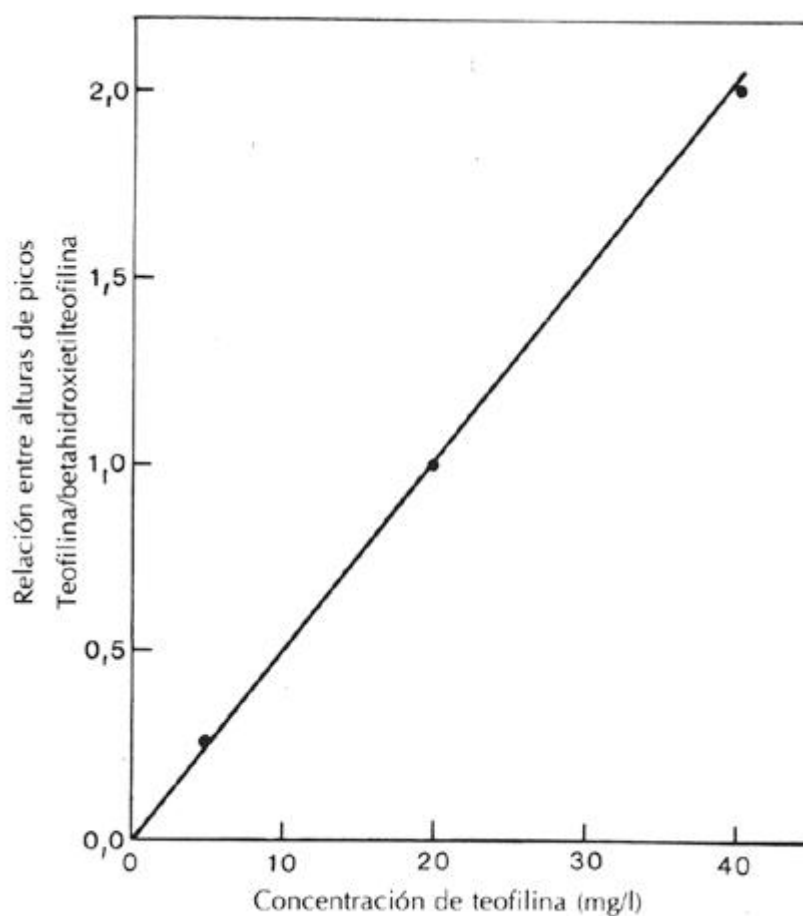


Figura 6-3 Curva de calibración de teofilina usando la técnica del standard interno.

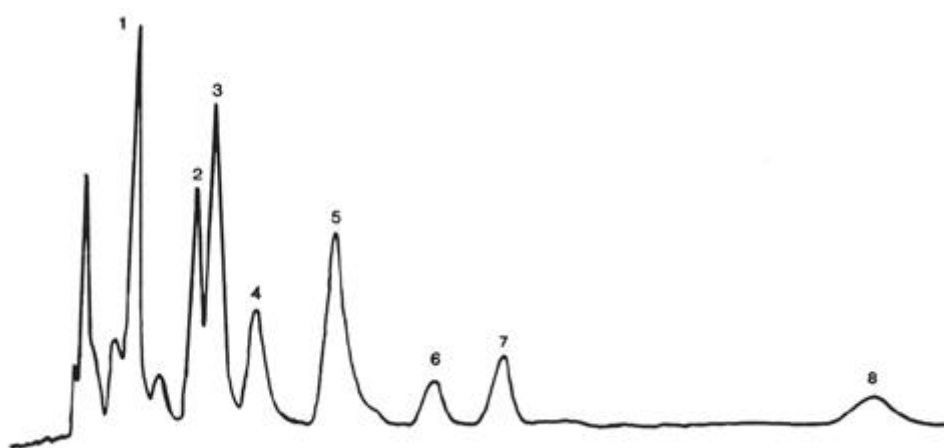


Figura 6-4 Separación de ácidos biliares humanos conjugados por HPLC en fase inversa. Los picos corresponden a taurocolato, 1; tauroquenodesoxicolato, 2; taurodesoxicolato, 3; taurolitocolato, 4; glicocolato, 5; glicoquenodesoxicolato, 6;

glicodesoxicolato, 7; y glicolitocolato, 8. (De: Roberts G, Bowers LD, *datos no publicados*).

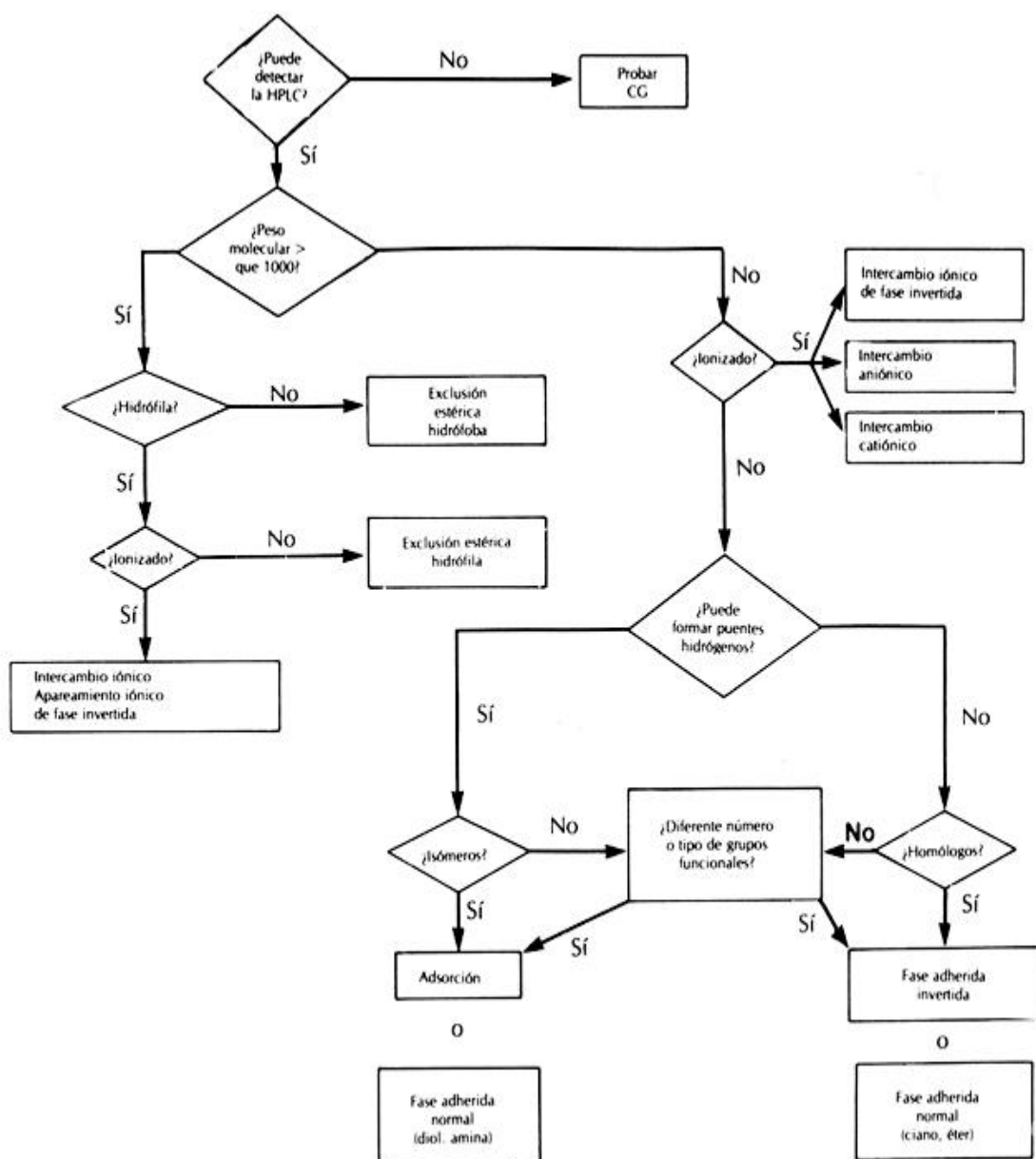


Figura 6-5 Guía para la selección de modos cromatográficos. (De: Bowers LD, Carr PW: *Quantitative aspects of HPLC workshop*, Minneapolis, 1983.)

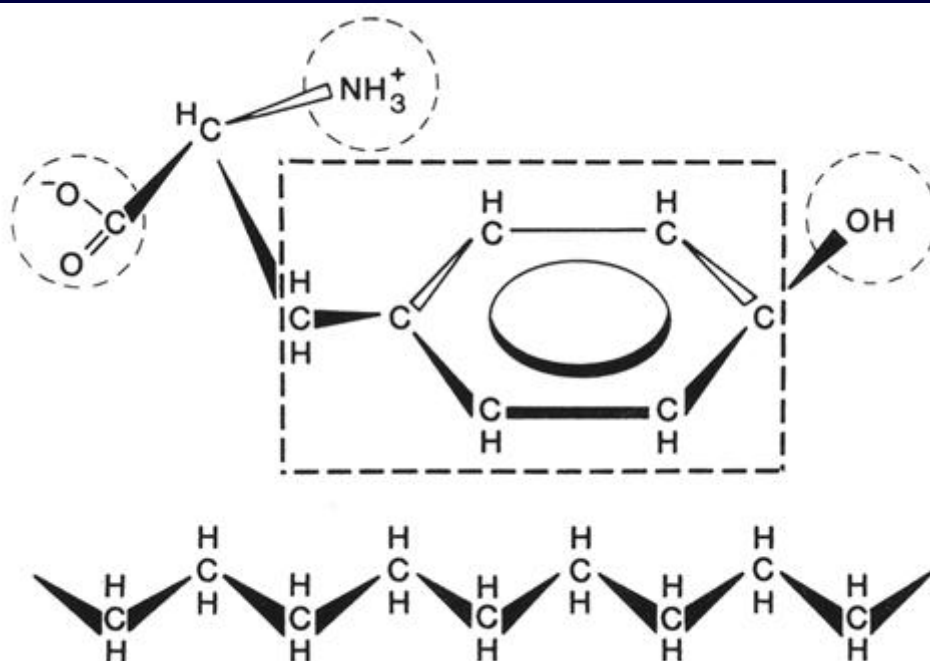


Figura 6-6 La retención en cromatografía de fase inversa es el resultado de la interacción de la parte no polar del compuesto, como la tiroxina, (dentro del recuadro) con la fase estacionaria no polar. Los grupos hidrofílicos (dentro del círculo) tienden a disminuir la retención.

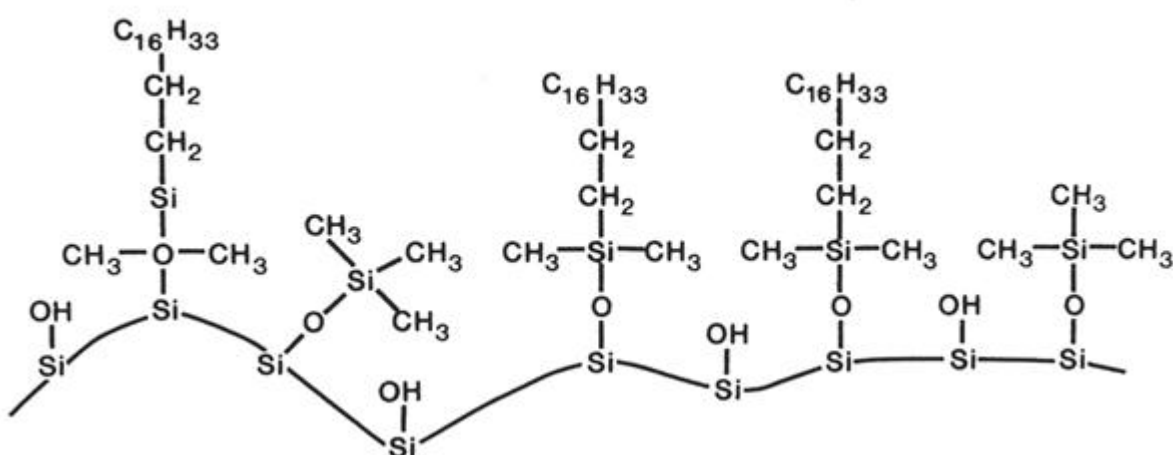


Figura 6-7 Diagrama esquemático de un soporte de fase inversa octadecilo con base de sílica que ha sido totalmente recubierto. Observar la presencia de grupos silanoles residuales en la superficie.

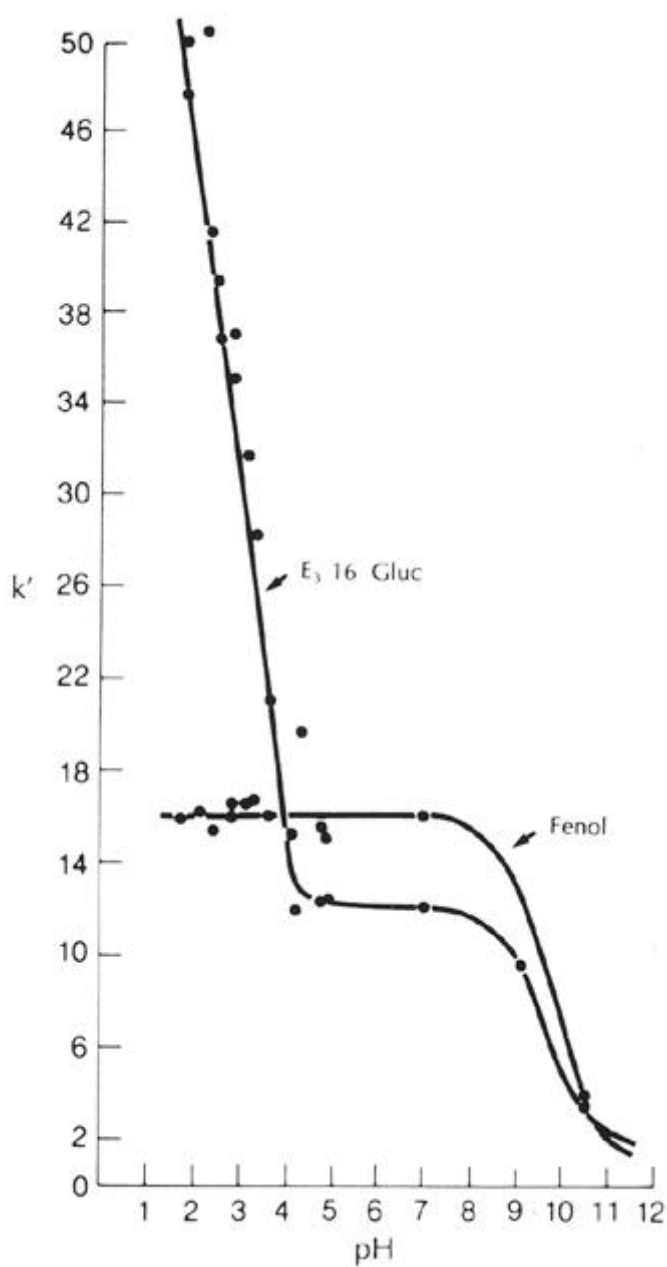


Figura 6-8 Variación de k' en función del pH para estriol-16a-glucurónido y fenol. La disminución de k' a pH 2 es atribuible a la ionización del ácido glucurónico; la disminución a pH 10 es atribuible a la ionización del grupo fenólico. (De: Oliphant C, Bowers LD, *datos no publicados*.)

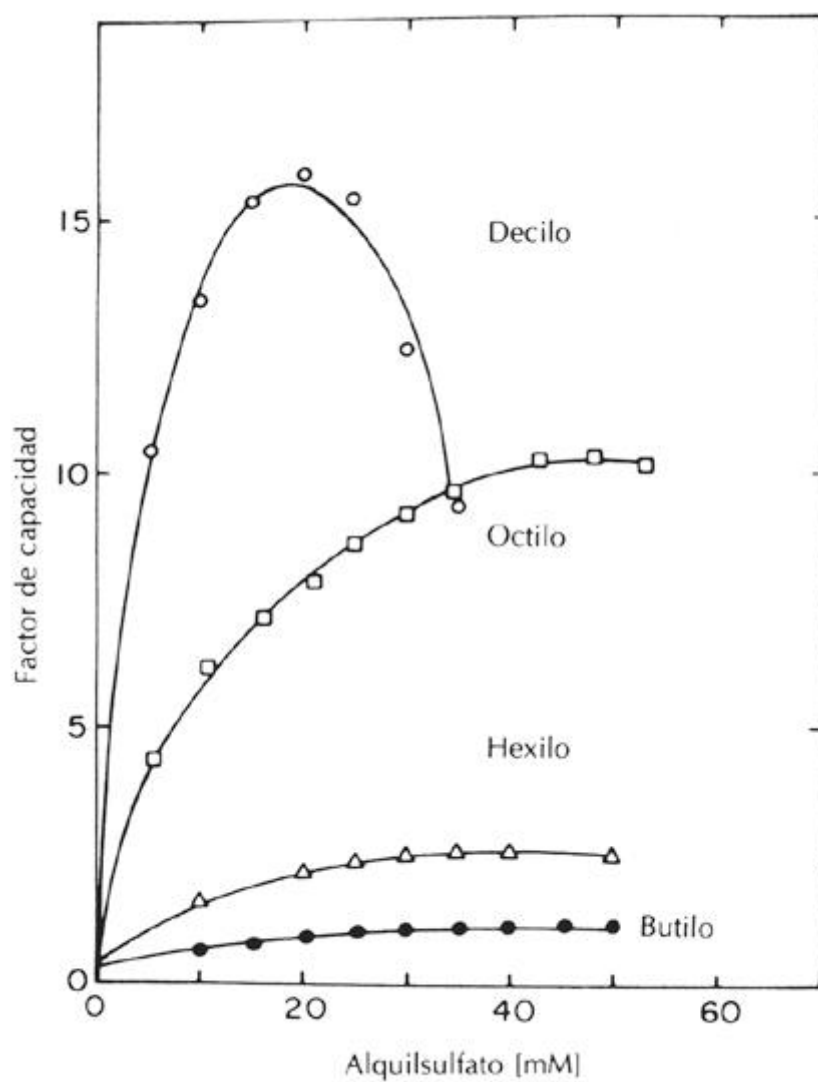


Figura 6-9 Variación del factor de capacidad, k' , de la epinefrina en función de la concentración de par iónico para varios n-alquilsulfonatos. (De: Horvath C et al: *Anal Chem* 49:2295, 1977.)

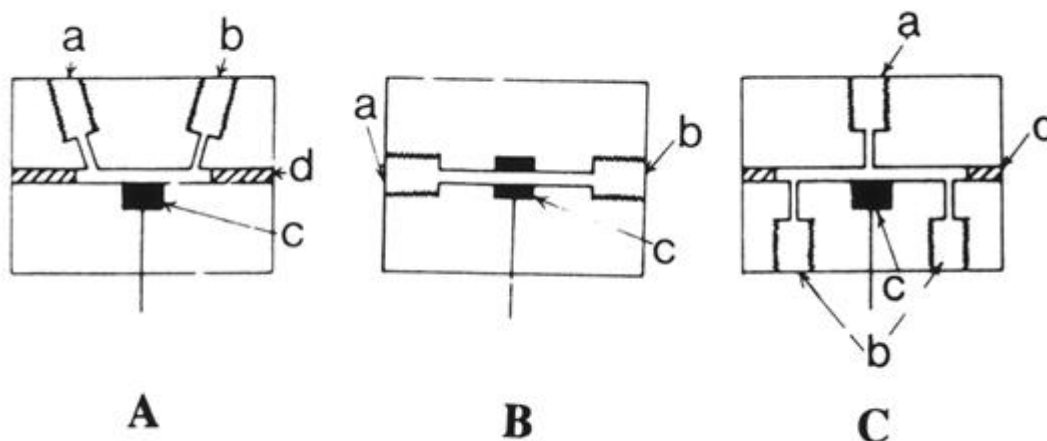


Figura 6-10 Diagrama esquemático de capa fina de canal, *A*; tubular, *B*; y “wall-jet”, *C*. (De: Weber SG: *I & EC Product Research and Development* 20:593, 1981.)

CAPÍTULO 7

7. Cromatografía de Gases

Alphonse Poklis

Moléculas que pueden ser separadas por
cromatografía de gases
Teoría de la separación por cromatografía de gases
Coeficiente de partición (KD)
Partición en sistemas de CG
Dependencia de la temperatura
Desempeño de la columna.

Consideraciones sobre la fase móvil

Consideraciones sobre la fase estacionaria

Fase estacionaria gas-sólido

Soportes de gas-líquido-sólido para la CGL

Fases líquidas

Obtención de derivados



Selección de un sistema de separación

Seleccionando la fase móvil

Selección de la fase estacionaria

Componentes del cromatógrafo de gases

Gas acarreador

Puerto de inyección de la muestra

Tubería de las columnas

Compartimento térmico

Detectores

Aplicaciones de la CG en química clínica

OBJETIVOS

- Presentar un diagrama de los componentes básicos de un sistema de cromatografía de gas, describir la función de cada componente, y resumir los mecanismos de cromatografía de gas líquido y gas sólido.
- Explicar la importancia de la dependencia de la temperatura en la cromatografía de gases y remarcar porqué la temperatura es el parámetro individual más relevante.
- Mencionar cuatro acarreadores de gas comunes y establecer la función de un acarreador de gas, resumir los criterios para la selección de un acarreador de gas apropiado para la separación cromatográfica.
- Definir la obtención de derivados y explicar porqué se utiliza este proceso en la cromatografía de gases.
- Describir la operación de los seis tipos de detectores que se pueden usar en la cromatografía de gases.

Términos clave

columna de apertura amplia Columna tubular abierta con un diámetro interno de 0.50 a 0.75 mm.

columna capilar Columna tubular abierta que tiene un diámetro interno de 0.20 a 0.35 mm.

columna empacada Columna cromatográfica de CG en la cual el soporte de la fase estacionaria consiste de material particulado que rellena la columna.

columna tubular abierta Columna de CG es en la cual la fase estacionaria cubre las paredes internas de la columna.

compartimento térmico Horno de temperatura regulada en el cual se coloca la columna de cromatografía.

constante de McReynolds Constante que describe un sistema usado para clasificar la fase estacionaria en términos de su capacidad para separar diferentes compuestos.

constante de roherschneider Similar a la constante de McReynolds.

cromatografía de gases Técnica física que separa los componentes basándose en su distribución entre una fase estacionaria y una gaseosa.

cromatografía de gas-líquido Técnica de separación en la cual la fase estacionaria es un líquido.

cromatografía de gas-sólido Técnica de separación en la cual la fase estacionaria es un sólido.

cromatograma de iones seleccionados Técnica en la que solamente se registran y cuantifican los fragmentos de masa de un tamaño preseleccionado utilizando el



espectrómetro de masas.

derivado Una molécula químicamente alterada a partir de una original. En CG, usualmente se refiere a grupos químicos agregados para incrementar la volatilidad del compuesto inicial.

detector de captura de electrones Aparato que libera partículas beta dentro del flujo del gas acarreador, produciendo electrones de baja energía, los cuales son capturados por los compuestos eluidos y los cambios resultantes en corriente son cuantificados. Este tipo de detector es muy sensible y específico para compuestos con grupos químicos con alta electronegatividad, como los halógenos.

detector de conductividad térmica Aparato que mide la diferencia entre las conductividades del calor del conductor de gas y las de los efluentes gaseosos de la muestra. La muestra conducida en el gas aumenta la conductividad del calor.

detector de ionización de flama Aparato en el cual los componentes eluidos son mezclados con hidrógeno y quemados en el aire para producir una flama que ioniza estos componentes. Un par de electrodos miden el número de iones.

detector de nitrógeno y fósforo Aparato similar al detector de ionización de flama pero que tiene en su interior metales alcalinos. Cuando los compuestos que contienen nitrógeno o fósforo son quemados, aumenta la liberación del vapor del metal alcalino y consecuentemente aumenta el flujo de la corriente.

difusividad Capacidad de las moléculas para difundirse o distribuirse debido a la energía térmica inherente en la molécula.

espectrómetro de masas Aparato que puede ser considerado como un detector de cromatografía de gases. Los compuestos son fragmentados en grupos específicos de moléculas cargadas, las cuales son separadas en sus componentes de masa y carga, y su abundancia relativa es cuantificada.

ecuación de Van Deemter Relaciona la altura equivalente de platos teóricos (llamada también HETP por sus siglas en inglés) con la velocidad lineal del gas acarreador.

fase líquida Es el fluido no volátil que cubre el medio de soporte fijo. Estos fluidos tienen la propiedad de actuar como solventes a fin de lograr la separación de los compuestos.

razón de fases Razón del volumen de una fase móvil (gas) entre el volumen de una fase estacionaria (columna), usualmente indicada por el término "β".

fragmento de masa Es una porción degradada de una molécula que contiene una o más cargas.

impacto de electrones Fragmentación de moléculas en fragmentos cargados específicos, resultantes de la colisión con electrones de alta energía.

índice de Kovats Este índice relaciona el logaritmo del tiempo de retención de un compuesto, independientemente de su naturaleza química, con los de las *n*-parafinas.

índice de retención Es un sistema que relaciona el tiempo de retención con un estándar.

ionización química El componente molecular que se va a analizar es mezclado con un gas ionizado, como el metano o el isobutano. Una carga positiva es transferida a la molécula, la molécula cargada M^{+1} y sus fragmentos son separados por el espectrómetro de masas, y se determinan su tamaño y abundancia relativa. (M significa masa).

ionizaciones químicas negativas Es similar a la ionización química excepto que el gas es oxígeno o hidrógeno, el cual produce principalmente iones negativos de la forma M^{-1} (donde M significa "masa").



plato Término cromatográfico que se usa para nombrar una unidad de partición del sistema cromatográfico.

platos efectivos (número de platos efectivos) Son el número de divisiones que están disponibles prácticamente en una columna.

líquido no volátil Fluido que no se evapora o que tiene una forma que es fácilmente gaseoso en la naturaleza.

no polar Se aplica generalmente a moléculas que tienen una afinidad hidrofóbica, significa literalmente “repulsión al agua”. Las sustancias no polares tienden a disolverse en solventes no polares.

polar Usualmente se aplica a moléculas que tienen una afinidad hidrofílica, significa literalmente “atracción por el agua”. Las sustancias polares tienden a disolverse en sustancias polares.

puerto de inyección Aparato que usualmente tiene un septum y un bloque de calentamiento para volatizar los compuestos que se van a separar. Se coloca antes de la columna.

regulador de flujo Sistema de válvulas que se instala para producir una presión de gas deseada y así controlar la velocidad del movimiento del gas (flujo) a través de un sistema de cromatografía de gases.

separador Dispositivo que remueve grandes porciones del gas acarreador y concentra los solutos antes de entrar al espectrómetro de masas.

silanización Es el proceso químico que consiste en convertir la porción del SiOH de una fase estacionaria a la forma del éster.

sitios activos Sitios, ubicados usualmente en la fase estacionaria, que unen reversiblemente al compuesto que va a ser separado.

sobrecarga Cuando una gran cantidad de un compuesto es expuesta para adsorberse por la fase estacionaria, ocurre un desequilibrio entre las dos fases.

adsorbente Material que tiene la propiedad de interactuar con el compuesto de interés, usualmente para hacer que éste se una.

septum Dispositivo que separa la columna cromatográfica del ambiente del laboratorio. Normalmente es un pequeño disco de goma de silicona a través del cual la solución que se va a separar es inyectada dentro de la columna.

tiempo de retención corregido Es la cantidad de tiempo que un compuesto es retenido en la columna, menos el tiempo de retraso del gas.

tiempo de retención relativo Razón dada por el tiempo de retención corregido del compuesto de referencia entre el del compuesto de la muestra.

tiempo de retraso del gas Es la cantidad de tiempo que toma conducir el gas desde el puerto de inyección hasta el detector, similar al volumen muerto en la cromatografía de líquidos.

transferencia de masa Es el movimiento de masa de una fase a otra.

espectrómetro infrarrojo con transformadas de Fourier Es un aparato que puede ser considerado como un detector cromatográfico de gases. Las líneas espectrales infrarrojas de compuestos son obtenidas a medida que los compuestos se eluyen del cromatógrafo.

La cromatografía es una técnica física que separa dos o más compuestos sobre la base de su distribución entre dos fases, una estacionaria y una móvil. Se recomienda repasar el Capítulo 5, que ofrece una descripción de la teoría básica y la práctica de las separaciones



cromatográficas. La fase estacionaria puede ser un líquido o un sólido, y en la cromatografía de gases (CG) la fase móvil es un gas que pasa a través de la fase estacionaria. Cuando se obtiene la separación de los componentes de la muestra mediante el uso de una fase móvil gaseosa y una fase estacionaria, que consiste en una capa delgada de un líquido no volátil retenido sobre un soporte sólido, la técnica es llamada cromatografía de gas-líquido, CGL (“Gas Liquid Chromatography” o “GLC”, en inglés). La cromatografía de gas-sólido, CGS, (“Gas Solid Chromatography” o “GSC”, en inglés) emplea un adsorbente sólido como la fase estacionaria. Tanto la CGL como la CGS, también pueden ser diferenciadas basándose en la clase de soporte de la fase estacionaria. En la CGL, cuando la fase líquida forma una cubierta sobre la superficie de pequeñas partículas o el adsorbente sólido en la CGS consiste de pequeñas partículas, la columna actúa como un contenedor de la fase estacionaria. Esta técnica es conocida como “cromatografía de gases en columna empacada.” Cuando la fase líquida de la CGL o el adsorbente sólido cubre las paredes internas de la columna, la misma columna actúa como un soporte de la fase estacionaria. Esta técnica es conocida como “cromatografía de gases de apertura tubular” o “cromatografía capilar de gases”. Independientemente del tipo de fase móvil o estacionaria, la separación se logra por las diferencias en partición de las diversas moléculas de la muestra entre las dos fases.

La separación por cromatografía de gas es ilustrada por el siguiente ejemplo: Una muestra conteniendo los componentes a ser separados es inyectada dentro de un bloque caliente, en el cual dichos componentes son inmediatamente vaporizados y conducidos por un flujo del gas acarreador a través de la fase estacionaria de una columna. Los componentes son adsorbidos sobre la fase estacionaria en el frente de la columna y luego son gradualmente removidos (proceso inverso a la adsorción) por gas acarreador nuevo. La partición entre las dos fases se lleva a cabo repetidamente a medida que el gas acarreador desplaza los componentes hacia la salida de la columna.

A medida que los componentes son eluidos, entran en un detector donde su presencia es convertida en una señal eléctrica, la cual es medida usualmente por una tira registradora de papel que produce una serie de picos graficados contra el tiempo. (Fig. 7-1). El tiempo de aparición, altura, ancho, y área de estos picos del cromatograma pueden ser medidos para producir valiosos datos cualitativos y cuantitativos.

Moléculas que Pueden ser Separados por Cromatografía de Gases

Teóricamente cualquier compuesto que pueda ser evaporado o convertido en un derivado volátil, puede ser analizado por cromatografía de gases. Pueden ser analizados exitosamente compuestos tan pequeños como el monóxido de carbono y metano o compuestos de hasta 800 daltones. Los compuestos mayores de 800 daltones carecen de suficiente volatilidad. Generalmente un compuesto puede ser estable en forma de vapor para producir un sólo pico cromatográfico identificable. Los compuestos inestables pueden ser convertidos a derivados volátiles estables. Sin embargo, si un compuesto se degrada en productos conocidos o en un número consistente de productos, el patrón resultante de múltiples compuestos puede ser usado como una forma tentativa de identificación.

Los compuestos inorgánicos o las sales inorgánicas de ácidos y bases orgánicos, carecen de suficiente volatilidad para el análisis de cromatografía de gases. Por lo tanto la



técnica se aplica generalmente al análisis de moléculas orgánicas en sus respectivas formas neutras no iónicas. Antes del análisis cromatográfico, los compuestos son generalmente aislados y concentrados por medio de extracción con solvente y evaporación de éste hasta sequedad. Los residuos que contienen los compuestos analizados son disueltos en pequeñas cantidades de solventes volátiles orgánicos. La solución que contiene el compuesto es entonces cromatografiada. El compuesto analizado en forma de vapor no debe interactuar con el solvente. El solvente debe tener mayor volatilidad y mucho menos afinidad por la fase estacionaria que los compuestos analizados, de ese modo eluyen antes del compuesto analizado y no interfieren en el cromatograma.

Teoría de la Separación POR Cromatografía de Gases

A continuación se presenta una breve discusión de la teoría básica de la cromatografía y como ésta es aplicada a la cromatografía de gas-líquido. Se recomienda ver el Capítulo 5 para una revisión general de la teoría cromatográfica. Para un tratamiento más completo de la diversidad de complejas variables que influyen en la separación por cromatografía de gases, se pueden consultar las referencias 1 y 2, [ref\(233\)](#)

Coeficiente de partición (K_D)

Los conceptos generales de *partición* y *coeficiente de partición* de la muestra (K_D) han sido descritos en el capítulo 5 (ver ecuación 5-1 y págs. 109 y 121). De igual manera, las definiciones de *retención* y *tiempo de retención* y *factor de capacidad* (o velocidades de capacidad) han sido descritas en el Capítulo 5 en la pág. 113, y en la Fig. 7-1. Estos conceptos básicos son aplicados a la cromatografía de líquidos (CL) (Capítulo 6) y a la cromatografía de gases (CG). El tiempo de tránsito requerido para que el gas acarreador se mueva desde el punto de inyección hasta el final de la columna es llamado “tiempo de retraso del gas” o “tiempo muerto”, t_M (Fig. 7-1). Está constituido por el volumen interno del inyector, de la columna, y del detector y es equivalente al volumen muerto en la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). Un compuesto que no presente partición en la fase estacionaria ($K_D = 0$), será eluido de la columna al tiempo t_M .

Debido a que el “tiempo muerto” es una característica del cromatógrafo de gases específico empleado para el análisis (volúmenes del inyector y detector) y del volumen de la columna, dicho tiempo muerto es el mismo para todos los componentes de la muestra y no es relevante en la identificación. La diferencia entre el tiempo de retención no corregido y el tiempo muerto es llamado “tiempo de retención corregido”, t'_R

$$t'_R = t_R - t_M \quad \text{Ec. 7-1}$$

Sistemas de partición en la cromatografía de gases (CG)

El K_D , o tiempo corregido, t'_R , de un soluto en un sistema específico debe ser determinado experimentalmente, este no puede ser pronosticado fácilmente. El coeficiente de



partición y el tiempo de retención de un soluto están directamente relacionados y dependen de la afinidad del soluto por la fase estacionaria. La vieja regla “lo semejante disuelve a lo semejante” ofrece una guía simple sobre la afinidad del soluto. Los solutos polares tendrán coeficientes de partición mayores, K_D , por lo tanto mayores tiempos de retención en fases estacionarias hidrofílicas (polar) que en fases estacionarias hidrofóbicas (no polares). Igualmente, los solutos hidrofóbicos presentan mayores K_D 's y mayores tiempos de retención en la fase estacionaria más bien no polar que en la fase polar. Si dos solutos, uno hidrofóbico y otro polar son analizados juntos por cromatografía en una fase estacionaria polar, el soluto hidrofóbico tendrá menor afinidad por la fase que el soluto polar (K_D hidrofóbico $<$ K_D polar) y será eluido antes del soluto polar (t'_R hidrofóbico $<$ t'_R polar).

El K_D del soluto es expresado como una razón de concentraciones (cantidad/ volumen) y por lo tanto puede ser escrito como:

$$K_D = [W_S/V_S]/[W_M/V_M] = \frac{V_M}{V_S} \cdot \frac{W_S}{W_M}$$

W_S = Peso de la muestra en la fase estacionaria.

W_M = Peso de la muestra en la fase móvil

V_S = Volumen de la fase estacionaria

V_M = Volumen de la fase móvil

La razón entre la fase móvil (gas) y el volumen de la fase estacionaria (columna) (V_M/V_S) es llamada la razón de fases (β). La razón entre los pesos de la muestra (W_S/W_M) en cada fase es igual a la razón de capacidad, k . Por lo tanto el coeficiente de partición puede ser expresado como:

$$K_D = \beta k$$

La razón de fases y la razón de capacidad son características para una columna particular. Sin embargo, su producto, K_D , es independiente de la columna particular. Por lo tanto a medida que la razón de fases es mayor (y menor el volumen de fase estacionaria), menor será la razón de capacidad (menor tiempo de elución, t_R). En general, mientras menor es la razón de capacidad (t_R más corto), más difícil será alcanzar una separación dada. La cantidad de soluto analizado en una columna sin sobrecargar depende de la cantidad de la fase estacionaria que afecta a β . A mayor cantidad de la fase estacionaria, menor será β y k será mayor (mayor t_R).

Dependencia de la temperatura

La temperatura es el parámetro individual más importante en la separación por cromatografía de gases. Esto es atribuible a la gran dependencia del coeficiente de partición, K_D , en la temperatura. La relación inversa entre K_D y temperatura está dada por la ecuación:

$$\Delta H$$



$$\text{Log } K_d = \frac{H}{2.3 \cdot T_c} + \text{Constante}$$

Ec. 7-2

Donde H es el calor molar parcial de la solución del soluto en el estado líquido, R es la constante general del estado gaseoso, y T_c es la temperatura de la columna.

Esta ecuación demuestra que, en un sistema dado, a mayor temperatura de la columna menor es la K_D , lo que significa una menor razón de capacidad, k (tiempo de retención menor). Por lo tanto, el tiempo de retención de las moléculas del soluto puede ser fácilmente alterado cuando se modifica la temperatura de la columna. Aproximadamente, una disminución de 30° C en la temperatura de la columna aumentará el tiempo de retención aproximadamente al doble. Inversamente, un incremento de 30° C en la temperatura de la columna reducirá aproximadamente a la mitad el tiempo de retención. La influencia de la temperatura en la separación será tratada más adelante.

Desempeño de la columna

La capacidad de una columna para producir separaciones óptimas es medida por dos parámetros: *eficiencia*, que es la capacidad para producir picos angostos, y *resolución*, que es la capacidad de separar dos picos inmediatos.

El concepto general de *resolución*, *platos teóricos*, y *altura equivalente de un plato teórico* (AETP), empleados para describir la eficiencia de una columna, han sido definidos en el Capítulo 5 (págs. 110 a 113). La AETP (o H) usa el tiempo de retención no corregido, t_R . Si se emplea el tiempo de retención corregido, t'_R , entonces se usa la expresión *altura equivalente de un plato efectivo* o “Height Equivalent to an Effective Plate” o “HEEP”, en inglés), también denominada H . El término AETP define no solo la eficiencia de la columna, sino también la eficiencia total del sistema debido a los tiempos de retraso del gas del inyector, columna, y detector. Ya que el tiempo de retraso del gas varía en diferentes instrumentos, la eficiencia de la columna se expresa mejor por el número de platos efectivos (HEEP, o h).

La relación de la AETP con la velocidad lineal del gas, μ , es compleja. Los factores que afectan el flujo de gas son expresados por la ecuación de Van Deemter:

$$\text{AETP} = A + B/\mu + C\mu$$

En la cromatografía de gases en columna empacada, A es el término de difusión, el cual relaciona el efecto del diámetro de la partícula del soporte y el procedimiento de empaque de la columna con la distancia de la corriente de gas que persiste antes de que su velocidad sea alterada drásticamente por el soporte. B es el término de difusión longitudinal de gas, el cual relaciona el ensanchamiento del pico con el efecto de la difusión del gas que circula a lo largo de la dirección del flujo. C es el término de transferencia masa con la resistencia, que relaciona los procesos de difusión en las fases de gaseosa y líquida. La relación de la AETP con la velocidad lineal, cuando se grafica, corresponde a una hipérbola (ver Fig. 7-2). Si la pendiente de la parte ascendente de la curva es prolongada hacia abajo, intercepta el eje “y”, produciendo el valor del término A (la contribución de la adición del flujo de gas a la AETP). En las columnas tubulares abiertas, el gas pasa y no es inhibido, el intercepto del término A es cero y la ecuación de Van Deemter es reducida a:



$$AETP = B/\mu + C\mu$$

De esta manera, las columnas tubulares abiertas tendrán menos HETPs y mucha mayor eficiencia que las columnas empacadas^{ref(234)} (Tabla 7-1). Finalmente, la curva de Van Deemter alcanza un mínimo, el cual es la velocidad óptima (μ_{opt}) que genera la AETP más pequeña. Para las columnas tubulares abiertas la mínima AETP está determinada solamente por la velocidad de flujo y la resistencia a la transferencia de masa, C :. La parte descendente de la curva (desde μ_{opt} hasta el eje “y”) representa el término B de difusión longitudinal.

Debido a que no hay soporte o partículas de adsorbente impidiendo la difusión a través de la columna en las columnas tubulares abiertas, la velocidad del gas acarreador debe ser mucho mayor que la de las columnas empacadas (Tabla 7-1). Por consiguiente la gráfica de Van Deemter es desplazada considerablemente hacia la derecha (μ_{opt} aumentada) para las columnas tubulares abiertas.

La velocidad óptima es ideal para un solo compuesto; sin embargo, compuestos similares poseen velocidades óptimas muy parecidas, y por lo tanto una sola velocidad de flujo es apropiada para su separación. A velocidades de flujo mayores, el gas barre las moléculas que difunden del líquido antes de que todas hayan salido, resultando en el ensanchamiento del pico.

Consideraciones Sobre la Fase Móvil

Los gases acarreadores más comúnmente utilizados son presentados en la Tabla 7-2. El gas acarreador debe ser inerte para que no reaccione con los componentes de la muestra. Grandes cantidades de gas relativamente puro deben estar comercialmente disponibles, porque se utilizan cantidades considerables del gas acarreador para el análisis. Las impurezas comunes en el gas acarreador son la humedad, oxígeno, e hidrocarburos. Cada uno de esos contaminantes puede afectar adversamente varios tipos de detectores, produciendo picos extraños. En ciertas situaciones, las impurezas del gas acarreador pueden interaccionar con los componentes de la muestra e impedir su análisis. Por ejemplo, el nitrógeno grado prepurificado contiene más de 20 ppm de oxígeno. Si se requieren altas temperaturas en la columna para separar los compuestos que se oxidan fácilmente, las impurezas de oxígeno en el nitrógeno usado como gas acarreador puede degradar los compuestos en la columna e impedir su detección, o puede producir múltiples picos extraños resultantes de la degradación. En una situación similar, el helio, que contiene menos contaminación con oxígeno, debe reemplazar al nitrógeno como gas acarreador.

La elección del gas acarreador afecta el desempeño de la columna (eficiencia y resolución) y el tiempo requerido para el análisis (tiempo de retención). Como es presentado por la ecuación de Van Deemter, la altura equivalente de un plato teórico (AETP) está relacionada con la velocidad lineal (μ) del gas acarreador. Esta interacción es muy compleja, pero la siguiente discusión presenta los efectos básicos del gas acarreador sobre la separación.

En un sistema de flujo (columna) donde el gas es compresible, la densidad, presión, y velocidad del gas son diferentes en cada punto en la columna. El gas acarreador es



compresible, y el valor de la velocidad del gas acarreador debe ser corregido a las condiciones promedio. La velocidad lineal promedio del gas (μ) es determinada por dos factores: (1) El tiempo necesario para que un soluto no retenido pase a través de la columna (tiempo muerto, t_M) (pág. 153) y (2) la longitud de la columna, L . Estos factores determinan μ mediante la siguiente ecuación:

$$\mu = L/t_M$$

Ec. 7-3

En una columna dada, la velocidad lineal óptima del el gas (μ_{opt}) es proporcional a la difusividad de los vapores de las sustancias que están siendo analizadas cromatográficamente. Sin embargo, la teoría cinética de los gases establece que la difusividad del gas es inversamente proporcional a la raíz cuadrada del peso molecular o a la densidad del gas (ver Tabla 7-2). Por lo tanto la μ_{opt} será menor para los gases de alta densidad (baja difusividad del soluto), como son el nitrógeno y el argón, y será mayor para los gases de baja densidad (alta difusividad del soluto), como son el helio y el hidrógeno. Por lo tanto en la misma columna serán obtenidos diferentes valores de μ_{opt} para diferentes gases. La Fig. 7-2 muestra la relación entre la μ de dos diferentes gases acarreadores y la AETP resultante. El nitrógeno tiene una AETP mínima de 0.465 a una μ_{opt} de 7 cm/seg, mientras que el helio tiene una AETP mínima de 0.55 a una μ_{opt} de 17.5 cm/seg. Esto demuestra que en la misma longitud de la columna, un gas de alta densidad (nitrógeno o argón) produciría una mejor eficiencia (más platos teóricos por unidad de longitud, menor AETP) que un gas de baja densidad (helio o hidrógeno). Para un sistema dado, la resolución máxima se obtendrá a una h mínima, la cual está determinada a la μ_{opt} del gas acarreador. También, para una longitud dada de la columna, se logrará una mejor resolución por el gas acarreador que produce el menor valor de h .

Para un gas de baja densidad, la difusividad del soluto y la μ_{opt} en una columna dada son mayores que las de un gas de alta densidad. Por lo tanto, se obtienen tiempos de retención mas cortos (pequeños t_R) con helio o hidrógeno que con nitrógeno o argón.

Consideraciones Sobre la Fase Estacionaria

Fases estacionarias de gas-sólido

En la cromatografía de gas sólido la columna está empacada o la pared interna está revestida con un material sólido adsorbente en el cual los componentes de la muestra llevan a cabo la partición mediante la adsorción sobre la superficie del sólido. Este material debe poseer una gran área de superficie por unidad de volumen para asegurar un equilibrio rápido entre las fases estacionaria y gaseosa. También debe tener partículas de tamaño uniforme y una estructura porosa, y ser suficientemente fuerte para resistir tensiones mecánicas durante el manejo y el empacado de la columna. Teóricamente cuanto menor es el tamaño de las partículas del soporte, mayor es la eficiencia de la columna. Sin embargo, mientras más pequeñas son las partículas, mayor es la resistencia al flujo y por consiguiente se requiere una mayor presión del gas acarreador.

Los sólidos cromatográficos más comunes para las fases de adsorción están hechos de



tierra de diatomeas (kieselguhr). El Kieselguhr blanco procesado es vendido bajo varios nombres comerciales: Chromosorb W, Celite, Gas Chrom, y Anakrom. La diatomita puede también ser aplastada, mezclada, prensada dentro de un bloque y procesada de manera tal que las impurezas minerales forman óxidos y silicatos, las cuales les dan al material un color rosado. Es comercializada como ladrillo refractario triturado, o Chromosorb P. Este material tiene alta densidad y es menos frágil que el material blanco. El tamaño del poro del material rosado es de solo 2 mm comparado con 9 mm del blanco. Por lo tanto se obtiene mayor eficiencia con el material rosado.

Cada soporte procesa propiedades individuales que pueden aumentar o impedir su uso para una aplicación particular. El material blanco es ligeramente alcalino e interactuará con componentes ácidos. Sin embargo su superficie, no es adsorbente, una propiedad que favorece su aplicación para el análisis de compuestos polares. El material rosado adsorbe compuestos polares; de esta manera es más conveniente para la separación de moléculas no polares como los hidrocarburos.

Otro tipo de fase estacionaria sólida consiste de cuentas de polímeros porosos, lo cual permite que las moléculas analizadas lleven a cabo la partición directamente desde la fase gaseosa a los polímeros amorfos. El Porapak, un polímero de etilvinilbenceno unido transversalmente con vinilbenceno, es la fase polimérica más popular. El material puede ser modificado por copolimerización con varios monómeros polares para producir cuentas de polaridad variable. Las columnas de Porapak son térmicamente estables hasta 250° C. A temperaturas por encima de 250° C, el material de la columna el Porapak será degradado y eluido, un fenómeno llamado *sangrado de la columna*. Estos productos de degradación pueden ser observados mediante el detector. El agua y las moléculas altamente polares son rápidamente eluidos del polímero. El Porapak es especialmente útil para separaciones a partir de la línea basal de muestras acuosas que contienen alcoholes de bajo peso molecular, ésteres, halógenos, hidrocarburos, cetonas, y mercaptanos (Tabla 7-3).

Soportes de gas-líquido-sólido para la CGL

La fase estacionaria en la cromatografía de gas-líquido es una delgada película de líquido sostenida sobre un soporte inerte. En la cromatografía capilar, el líquido está cubriendo las paredes del tubo. En las columnas empacadas, el líquido está sostenido en una capa delgada de la columna sobre la superficie de un soporte inerte (Fig. 7-3). Muchos materiales que actúan como fases estacionarias para la CGS son también soportes que se usan para la fase líquida en CGL. Ambas fases sólidas, la rosada y la blanca descritas anteriormente son soportes líquidos populares. Aunque el soporte puede ser inerte y no influir en la separación, tanto los materiales rosado como los blancos tienen *sitios activos* debido a las impurezas metálicas y los grupos químicos silanol ($-\text{SiOH}$) y siloxano ($\text{SiOSi}-$), los cuales forman puentes de hidrógeno con los compuestos polares. Esta interacción genera picos distorsionados (asimétricos) en el cromatograma resultante de la GLC. Estos *sitios activos* pueden ser removidos mediante el lavado ácido de las impurezas minerales del soporte, y por conversión de los grupos de silanol a los silil ésteres (silanización) de dimetildiclorosilano o hexametildisilazona. La silanización reduce la actividad de la superficie pero también el área superficial del soporte, de manera que puede ser aplicado no más del 10 % (v/w) de la fase estacionaria líquida al total del peso de la columna. En ciertos casos, se mezclan aditivos



especiales con la fase líquida para bloquear los sitios activos del material de soporte no tratado. Dos ejemplos son la incorporación del ácido esteárico en aceite de silicona usado en la separación de ácidos grasos y la adición del hidróxido de potasio a las fases líquidas polares usadas para separar aminas.

En la cromatografía tubular abierta, el líquido está cubriendo las paredes de la columna. Las fuerzas cohesivas de la mayoría de las fases líquidas son mayores que las fuerzas adhesivas o de tensión superficial acuosa entre el líquido y la superficie de vidrio de la columna. Por lo tanto, para crear una película delgada uniforme la columna es tratada para producir una superficie adhesiva.[ref\(235\)](#) Varias técnicas son utilizadas: deposición de vapores de sílica, una microcapa de finas partículas de sales como el carbonato de bario o el cloruro de sodio, polvo de cuarzo, o el grabado de vidrio con ácido gaseoso seco. Estos tratamientos aumentan la “aspereza” de la superficie, permitiendo que el líquido llene los huecos y grietas y se distribuya a través de la superficie de la columna. Las características de la superficie de la columna pueden también ser alteradas por el tratamiento con agentes humidificantes, como el Carbowax 20 M, los cuales son adheridos fuertemente a los sitios de adsorción y desactivan la superficie. Después del tratamiento, son lavados los residuos de Carbowax 20 M de la columna, y la fase líquida de elección es aplicada sobre la superficie. Los datos informativos que describen la preparación, aplicación, y limitaciones de los materiales de soporte están fácilmente disponibles por los fabricantes comerciales y distribuidores.

Fases líquidas

La popularidad universal de la CGL como método de separación es atribuible a la gran variedad de fases líquidas con diferentes propiedades en solución y por lo con tanto diferentes afinidades por varias clases de compuestos analizados. El rango de líquidos utilizados en la fase estacionaria está limitado solo por su volatilidad, estabilidad térmica, y capacidad para humidificar el soporte. No existe una sola fase estacionaria que pueda alcanzar todas las separaciones deseadas. Los distribuidores comerciales ofrecen típicamente alrededor de 100 a 200 fases líquidas; sin embargo, muchas de esas fases son duplicados que se venden bajo diferentes marcas o son tan similares que tienen solo pequeñas diferencia en sus capacidades de separación. De hecho, pocos laboratorios requieren del uso de más de media docena de diferentes fases líquidas. El 80% de un amplio rango de compuestos orgánicos puede ser exitosamente separado usando solo de cuatro a siete fases: OV-101, OV-17, Carbowax 20M, OV-225, DEGS, OV-275, y OV-210.[refs\(236\)](#) Algunos ejemplos de fases líquidas, características, y sus aplicaciones son presentados en la Tabla 7-3.

Las fases líquidas generalmente pueden ser clasificadas en cinco categorías: (1) fases no polares, que son hidrocarburos líquidos como el escualeno, grasas de silicona, Apiezon L, y goma de silicona. Generalmente los compuestos son eluidos de estas fases en orden creciente de su punto de ebullición. (2) Fases de polaridad intermedia, que incluyen grupos polares o polarizables unidos a un largo esqueleto no polar, como los ésteres de alto peso molecular o los alcoholes como el diisodecilftalato. Ambos compuestos polares y no polares son separados por esas fases, siendo los más polares los que eluyen primero. (3) Fases polares que contienen una alta concentración de grupos polares, como los carbowaxes. Estas fases discriminan entre los compuestos polares y no polares por la fuerte interacción que ocurre solamente con los compuestos polares, por consiguiente separan éstos de los compuestos



menos polares, que eluyen antes. (4) Fases de puentes de hidrógeno, las cuales contiene muchos átomos de hidrógeno fácilmente disponibles para formar puentes de hidrógeno, como las fases de glicol. Los compuestos polares tienen mayor afinidad por la fase estacionaria y son eluidos más lentamente. (5) Fases con propósitos especiales que pueden ser preparadas para usar una interacción química específica entre la muestra y la fase estacionaria. Un ejemplo de estas fases es el nitrato de plata disuelto en glicol para aumentar la separación de hidrocarburos insaturados mediante interacciones de transferencia de cargas.

Cada fase líquida tiene un rango de temperatura específico para un uso más eficiente (Tabla 7-3). La máxima temperatura en la cual una fase puede ser utilizada está determinada por su volatilidad. Más allá de esta temperatura la fase se pierde por descomposición o volatilización y es conducida al detector, produciendo un ruido considerable de fondo (sangrado de la columna). Una columna puede ser calentada por encima de la temperatura máxima por períodos cortos de tiempo, como ocurre cuando se establece un programa de temperatura, pero la máxima temperatura nunca debe excederse para el análisis isotérmico (temperatura constante). Por debajo de la temperatura mínima, el análisis de la viscosidad aumentada o solidificación del líquido no puede ser reproducido.

La cantidad de la fase estacionaria en la columna es expresada en porcentaje por peso de la fase líquida en el soporte. En general, los empaques de columnas contienen de 3 % a 10 % de fase líquida. Pueden ocurrir desviaciones de estos valores en aplicaciones específicas: cargas muy bajas de líquidos para compuestos de alto peso molecular y cargas altas para compuestos pequeños, altamente volátiles como los hidrocarburos que contienen de uno a cuatro átomos de carbono. La cantidad de la fase estacionaria afecta directamente la capacidad de la muestra y la eficiencia de la columna. Mientras mayor es la cantidad de fase líquida, mayor será la cantidad de muestra que puede ser analizada.

Los fabricantes de columnas tubulares abiertas con frecuencia utilizan nombres de marcas para las fases líquidas presentadas en la Tabla 7-3. No obstante, los nombres usualmente conservan una designación numérica para que el analista pueda reconocer la composición de la fase líquida como está explicada en la tabla. Por ejemplo, una columna capilar de HP-1 ó DB-1 contiene 100 % de dimetil poli-siloxano (simeticona), comparable con OV-1 (Tabla 7-3) producido por Hewlett Packard y J&W Scientific, respectivamente.

Las columnas tubulares abiertas contienen pequeñas cantidades de fase estacionaria que reducen significativamente la capacidad de la columna. Las columnas capilares con diámetros internos (DI) de 0.2 mm tienen capacidades menores de 100 ng del componente de la muestra. La capacidad de la muestra aumenta al incrementar el DI de la columna. Por ejemplo, las columnas de 0.32 mm aceptarán hasta 500 ng del componente de la muestra, mientras que las columnas con 0.53 mm tienen una capacidad de hasta 2000 ng del componente de la muestra. Las columnas con DI 0.75 mm tienen una capacidad semejante a las columnas empacadas (15,000 ng). Estas columnas con DI mayores (0.50 a 0.75 mm) se conocen como columnas de “apertura amplia”.

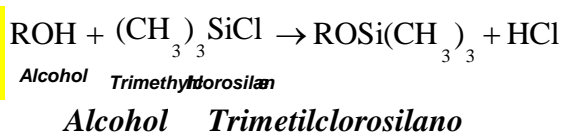
Obtención de Derivados

A menudo se desea modificar una molécula químicamente a fin de obtener un producto cuyas propiedades sean más convenientes que las de sus precursores. Uno puede necesitar



crear un derivado un compuesto para hacerlo volátil y estable como un gas, y por lo tanto analizable por CG. Los derivados también son preparados para lograr una mayor sensibilidad, selectividad, o especificidad para una separación dada. Los derivados pueden ser eluidos de la columna más rápido, con menos “coleo”, con picos más agudos, proporcionando estabilidad a los compuestos térmicamente lábiles, y con mejor resolución. La formación de derivados comprende una reacción química entre ciertos grupos funcionales de la molécula de la muestra (usualmente un grupo polar, que reduce la volatilidad o interactúa con la fase estacionaria para aumentar el tiempo de retención) y una molécula pequeña (agente derivatizante), para formar un nuevo producto de mayor volatilidad con un coeficiente de partición más pequeño (K_D). La derivatización puede llevarse a cabo antes de inyectar la muestra o puede ocurrir en el puerto de inyección del cromatógrafo (“en la columna” o “derivatización instantánea”). Aquí se presentan unas cuantas técnicas de síntesis de derivados, pero para una discusión más completa se recomienda consultar la literatura. [refs\(237\)](#)

Una técnica popular para la obtención de derivados en CG es la sustitución de un hidrógeno activo por un grupo trimetilsilil (TMS). Los silil derivados resultantes son usualmente menos polares y más volátiles y muestran mayor estabilidad térmica que sus compuestos originales. Los reactivos sililizantes reaccionan vigorosamente con el agua o con solventes que contienen alcohol; por lo tanto las reacciones de conversión se llevan a cabo en solventes anhidros como el acetonitrilo o el tetrahidrofurano. Los reactivos TMS son inflamables y algunos son altamente corrosivos, por lo que deben ser manipulados cuidadosamente.



Frecuentemente se usa la esterificación para el análisis en CG de compuestos que contienen un grupo carboxílico ácido. Los metil ésteres poseen la mayor volatilidad y por lo tanto son los más populares. Las reacciones de alquilación con hidróxidos de alquilamonio cuaternarios o con acetales de dialquil dimetilformamida se han hecho populares como reactivos “derivatizantes instantáneos”. La Fig. 7-4 muestra la reacción de derivatización del hidróxido de tetrametilamonio y fármacos barbitúricos. Para aumentar la sensibilidad, se usan reactivos derivatizantes que producen compuestos conteniendo halógenos o nitrógeno para determinarlos con detectores de captura de electrones.

Selección de un Sistema de Separación

Elección de la fase móvil

La fase móvil o gas acarreador tiene una función esencial de la cromatografía de gases: conducir la muestra vaporizada a través de la columna y dentro del detector. Como fue descrito anteriormente, para seleccionar el gas acarreador adecuado se deben tomar en cuenta tres consideraciones: (1) Los principios de operación del detector a través del cual el gas estará fluyendo continuamente, (2) la presencia de impurezas en el gas acarreador, y (3) la



velocidad deseada para el análisis y desempeño de la columna. Los compuestos que experimentan una partición insignificante dentro de la fase estacionaria no pueden ser separados entre sí. De igual manera, los compuestos con una gran afinidad por la fase estacionaria tendrán tiempos de retención inaceptablemente largos o pueden ser retardados irreversiblemente.

Selección de la fase estacionaria

Las fases líquidas con las mismas propiedades físicas de la muestra retendrán a ésta, y generalmente afectan la separación. Sin embargo, esta regla general no ayuda a determinar específicamente cuál es potencialmente la mejor fase estacionaria para una separación particular. Brevemente se presentan adelante varios enfoques para elegir la fase líquida para una separación deseada.

Los análisis de CG pueden ser afectados por muchas fuentes de irreproducibilidad. Estas incluyen variaciones en las condiciones del ensayo y variaciones en el empaque de la fase estacionaria (de lote a lote, de compañía a compañía, etc.). Para asegurar la identificación reproducible de los picos de interés, independientemente de las condiciones exactas del ensayo, los tiempos de retención relativos son convertidos a índices o constantes. Estos valores pueden entonces ser usados para comparar los datos entre los análisis, dentro del laboratorio, o entre laboratorios.

Índice de Kovacs.

Si los componentes de la muestra son conocidos, se puede seleccionar la fase estacionaria que es más probable que afecte la separación, mediante el uso del índice de retención de Kovacs.^{refs(238)} Los índices de retención relacionan los tiempos de retención de un compuesto, independientemente de su naturaleza química, con los de las *n*-parafinas (hidrocarburos de cadena lineal) eluidos directamente antes y después del compuesto analizado.

El análisis cromatográfico las *n*-parafinas en una columna dada y bajo condiciones establecidas genera una relación casi lineal entre el logaritmo de sus tiempos de retención, t_R , y el número de átomos de carbono de cada parafina, como se muestra en la Fig. 7-5. Cada *n*-parafina produce un índice de retención, *I*, que es 100 veces el número de átomos de carbono. El índice de retención los demás compuestos es calculado de la siguiente relación:

$$I = 100z + 100 [(\log t_{Rx} - \log t_{Rz}) / (\log t_{R(z+1)} - \log t_{Rz})] \quad \text{Ec. 7-4}$$

Donde *z* es el número de átomos de carbono en el compuesto desconocido; t_{Rx} es el tiempo de retención de una sustancia desconocida *x*; t_{Rz} es el tiempo de retención de la *n*-parafina eluida inmediatamente antes de *x*; y $t_{R(z+1)}$ es el tiempo de retención de la *n*-parafina eluida inmediatamente después de *x*. Por ejemplo, supongamos que los datos presentados en la Tabla 7-4 y representados gráficamente en la Fig. 7-5, fueron obtenidos por cromatografía de una serie de *n*-parafinas y benceno en una fase líquida dada. El índice de retención, *I*, benceno (*z* = 6) en esa fase líquida fue calculado como 650.



$$I = 100(6) + 100(0.052 / 0.104) = 600 + 50 = 650$$

El I calculado se aplica solamente a las condiciones particulares de fase estacionaria y de temperatura. No obstante, los efectos de la velocidad de flujo de la fase móvil y del porcentaje de carga (cantidad de fase líquida) cambiarán proporcionalmente el tiempo de retención de todas las n -parafinas, y de esta manera los valores calculados para I no cambiarán. Están disponibles extensas listas de índices de retención de numerosos compuestos en las fases líquidas en el *catálogo AMD 25A11 de la Recopilación sobre Datos de Cromatografía de Gases de la ASTM* y en un catálogo del suplemento *AMD 25A S-1*. En el caso de que vayan a ser separados simultáneamente varios compuestos de diferente naturaleza química, los compuestos de interés son localizados en la tabla y sus respectivos valores de I para varias fases estacionarias son señalados. Una diferencia de por lo menos 30 unidades de I entre los compuestos, indicará que una fase particular los separará eficientemente. Los valores de I están considerados a partir del ápice del pico solamente, y no dan indicación del ancho del pico. Por lo tanto los valores de I no indican la resolución de los compuestos. Sin embargo, debido a que los tiempos de retención aumentan con el índice de retención, I , los índices de retención indican el orden en el cual los compuestos serán eluidos de la columna. Una aplicación clínica de los valores de I , es la identificación cualitativa de medicamentos usando fases líquidas estándar bajo dos tipos de condiciones: isotérmicas y de temperatura programada.[ref\(239\)](#) Pueden usarse las bases de datos de los índices de retención de columnas empacadas para la identificación preliminar de los picos que eluyen de las columnas tubulares abiertas.[ref\(240\)](#)

Constantes de Rohrschneider y McReynolds.

Las constantes de Rohrschneider y McReynolds son sistemas relacionados que clasifican las fases estacionarias en términos de su poder de separación.[refs\(241\)](#) Los valores de I de un grupo de compuestos de referencia de polaridad variable, son determinados en la fase líquida que está siendo probada y se comparan con los valores de I para los mismos compuestos obtenidos en una fase líquida de referencia. El escualeno, un líquido no polar, es usado como la fase de referencia. Entonces, las constantes son calculadas como se indica en las siguientes ecuaciones:

$$\text{Rohrschneider constant } (x) = 1/100 (I_{\text{test phase}} - I_{\text{squalene}}) \quad \text{Ec. 7-5}$$

$$\text{McReynolds constant } (x') = (I_{\text{test phase}} - I_{\text{squalene}}) \quad \text{Ec. 7-6}$$

La Tabla 7-5 presenta datos relacionados con cinco compuestos de referencia usados para determinar las constantes de McReynolds. Ambas constantes de Rohrschneider y McReynolds pueden ser utilizadas para dos propósitos: para seleccionar una fase líquida en una aplicación particular y para clasificar las fases líquidas de acuerdo a que tan similares o diferentes son éstas en cuanto a su capacidad de realizar separaciones cromatográficas.[ref\(242\)](#) Un ejemplo del uso de la constante de McReynolds para seleccionar una fase líquida en una aplicación dada, sería la separación de los metil ésteres de ácidos grasos saturados e insaturados. Si uno tiene disponibles las fases líquidas 1 (DEGS) y 2 (Carbowax 20 M), enumeradas en la Tabla 7-6, un análisis de sus constantes de McReynolds permitirá elegir la mejor fase para la separación. Para la capacidad de separar los ésteres de ácidos grasos

saturados e insaturados, hay que tomar en cuenta las constantes x' (compuestos olefinicos, ésteres insaturados) y z' (ésteres) (Tabla 7-5). Las constantes de McReynold para x' y z' (en negritas, en la Tabla 7-5) son mayores para DEGS que para carbowax 20 M; por lo tanto el DEGS es más conveniente para la separación de los ésteres de ácidos grasos.

La caracterización de las fases líquidas en términos de su capacidad para realizar separaciones usando la constante de McReynolds, es presentada a través del examen de las fases 3 (Emulphor ON-870), 4 (Triton X-100), y 5 (XE-60) en la Tabla 7-6. Todas las fases líquidas están comercialmente disponibles y se pueden determinar las diferencias o similitudes en el poder de separación como se ilustra en la Tabla 7-6. Las fases líquidas 3 y 4 son casi idénticas en su capacidad para separar los compuestos de referencia. Por lo tanto, si se utilizan como una fase líquida, ellas podrían producir cromatogramas muy similares. La fase líquida 5 es similar a las fases 3 y 4 para las constantes x' y y' . Por lo tanto la separación de compuestos caracterizada por esas constantes (Tabla 7-6) en la fase 5(XE-60) será esencialmente la misma en las fases 3 (Emulphor EN-870) y 4 (Triton X-100). Las constante z' y u' son mayores para la fase 5, y la separación de los compuestos enumerados en la Tabla 7-5 para estas constantes sería mejor en XE-60 que en las otras dos fases. Sin embargo, aunque los ceto compuestos (constante z') son separados mejor en la fase 5, la separación de los alcoholes (constante y') sería prácticamente idéntica en las fases 3, 4 y 5. Cuando se usan las columnas empacadas, uno encuentra que la diferencia en las constantes de McReynolds de 20 unidades o menos son insignificantes. Las diferencias de 100 unidades de McReynolds indican una considerable mejor capacidad de separación de una fase comparada con la otra.

Componentes del Cromatógrafo de Gases

Básicamente un cromatógrafo de gases consta de seis componentes (Fig. 7-6): (1) Un gas acarreador presurizado con una presión auxiliar y reguladores de flujo, (2) un puerto de inyección de la muestra, (3) una columna, (4) un detector, (5) un electrómetro y registrador de señales, y (6) compartimentos regulados térmicamente que contienen la columna, detector, y puerto de inyección.

Gas acarreador

La eficiencia de un cromatógrafo de gas depende del flujo constante del gas acarreador. El gas acarreador proveniente de un tanque presurizado fluye a través de una válvula que posee una rótula, un medidor de flujo (de rango 1 a 1000 L/min), topes metálicos, y una válvula de presión (de 1 a 4 atmósferas). El flujo es ajustado por una aguja de válvula montada en la base del medidor de flujo. El gas se mueve más lentamente en el frente de la columna que en la salida, debido a la caída de presión a través de la columna. De esta manera, las velocidades de flujo son medidas a medida que el gas sale de la columna. Esto se hace con un medidor de flujo de burbuja de jabón. Una bureta con un brazo lateral que tiene un bulbo de hule lleno con una solución de jabón está conectado a la salida del detector. La velocidad de flujo se determina midiendo el tiempo que requiere una burbuja para pasar entre dos marcas de volumen calibradas en la bureta.

El gas acarreador debe ser inerte, seco, y puro. La mayoría de gases acarreadores más



comunes son inertes, pero pueden tener contaminantes que afecten el desempeño de la columna y la respuesta de los detectores de ionización. Los hidrocarburos gaseosos y el agua son removidos del gas acarreador usando una trampa de tamiz molecular entre el tanque de gas y el cromatógrafo.

Puerto de inyección de la muestra

La mayoría de los análisis por CG son realizado en muestras líquidas no acuosas, que son inyectadas con una microjeringa de vidrio. Una aguja se inserta a través de un septum dentro del bloque de calentamiento donde la muestra es vaporizada y conducida por un conductor de gas acarreador dentro de la columna. La presión dentro del puerto de inyección usualmente está muy por arriba de la presión atmosférica, y la corriente del gas acarreador se lleva la muestra y ayuda a la vaporización. De esta manera una muestra puede ser vaporizada a temperaturas por debajo de su punto de ebullición atmosférico. Sin embargo, en el puerto de inyección la temperatura está usualmente fijada de 25° a 50° C por encima del punto de ebullición de los componentes de interés en la muestra. Esto asegura que se lleve a cabo una ebullición inmediata y que los componentes no se diluirán por el gas acarreador, y por consiguiente entrarán en el frente de la columna como una sola banda. El tiempo requerido para la vaporización depende de la cantidad y volatilidad de la muestra. Las muestras diluidas se evaporan más rápido que las muestras concentradas.

Los compuestos con alto punto de ebullición o los que son sensibles a altas temperaturas, pueden ser diluidos con solventes volátiles, lo que abate la temperatura de inyección significativamente.

Debido a que el calentamiento del metal puede catalizar la degradación de muchos compuestos biológicos, muchos puertos de inyección están provistos con una revestimiento de vidrio o con una columna de vidrio que se extiende a través los lavadores de los inyectores hasta el septum. Esta última modalidad es llamada “sobre la columna de inyección”. Para alcanzar la máxima eficiencia es imperativo que la muestra tenga el volumen más pequeño posible (0.5 a 10 μL) de acuerdo a la sensibilidad del detector, y que sea inyectada como una sola banda y uniforme (“inyección de un golpe”). La inserción, inyección, y remoción de la aguja debe ser realizada rápida y suavemente. Las muestras gaseosas son inyectadas con una jeringa ajustada para gases o con una asa calibrada provista de una desviación. El asa consiste de un sistema de vidrio con tres válvulas. Entre dos de estas válvulas se encuentra atrapado un volumen estándar de gas, el cual es introducido a la corriente del gas acarreador al accionar las válvulas.

El punto consiste en un sistema de vidrio de tres llaves, entre dos de las cuales un volumen estándar de gas es atrapado e introducido dentro de una corriente del conductor de gas cuando se cambia la dirección mediante las llaves.

Debido a la baja capacidad de las columnas capilares, la inyección de muestras no diluidas a menudo sobrecargará la columna. Este problema puede ser evitado con sistemas capilares que fraccionen el flujo del gas acarreador después de la vaporización. En la técnica de la inyección fraccionada después de la vaporización de la muestra, el flujo del conductor de gas es dividido en dos partes con una razón variable de flujos. La parte más pequeña de la mezcla gas/muestra entra en la columna, mientras el flujo mayor es desviado de la entrada y sale del sistema. La razón del flujo hacia la entrada de la columna y hacia su salida es controlada por una válvula de aguja. Las razones de flujo pueden ajustarse sobre un amplio



rango (1:5 a 1:250).

Un septum separa la columna cromatográfica del ambiente del laboratorio. Los tabiques son pequeños discos de goma de silicona y están disponibles numerosos tipos, dependiendo de los requerimientos del compuesto analizado. Los septums de goma de silicona pueden absorber algunos tipos de muestras. Ciertos septums especiales (como los revestidos de Teflón R) ayudan a resolver este problema. Los solventes de bajo peso molecular utilizados en la fabricación de los septums pueden ser liberados cuando el puerto de inyección esta siendo calentado. Este “sangrado” del solvente puede producir picos extraños a la muestra (picos fantasmas) en los cromatogramas, y esto aumentará el ruido de fondo del detector. Hay disponibles comercialmente septums de bajo sangrado, a los cuales se les han extraído el solvente. Las inyecciones repetidas a través del septum destruirán gradualmente su resistencia mecánica, causando fugas. Como resultado, el tiempo de retención y la sensibilidad disminuyen a medida que el gas acarreador y parte de la muestra experimentan un contraflujo y son liberados a través del septum a la atmósfera. Este problema puede ser evitado fácilmente mediante la inserción rutinaria de nuevos septums.

Varios sistemas de inyección especializados están disponibles comercialmente. Si se van a realizar un gran número de análisis similares, se usan comúnmente unidades de muestreo automáticas.

Tubería de las columnas

La tubería de columna es un contenedor para la fase estacionaria (material de empaque) y dirige el flujo del gas acarreador. Debe ser inerte y no afectar la separación por reacción con la fase estacionaria o la muestra. Dependiendo de la cromatografía de gases empleada, las columna pueden tener forma de U, o en forma ya sea de espiral extendida o aplanada.

Las columnas de acero inoxidable y de cobre son a veces utilizados para los análisis que requieren temperaturas mayores que 250 °C. Sin embargo, en los análisis de fármacos, esteroides u otros compuestos biológicos, las columnas metálicas pueden absorber estos compuestos analizados y catalizar su degradación. Por lo tanto el vidrio es la tubería de elección para la mayoría de los análisis clínicos. Sin embargo, el vidrio es frágil e inflexible, y si no es manejado adecuadamente, las columnas se rompen fácilmente durante el transporte o la instalación. Recientemente ha sido recomendado el níquel como un sustituto para el vidrio. Las tuberías de níquel han sido utilizadas eficazmente en el análisis de drogas, pesticidas, y colesterol, los cuales previamente requerían de tubería de vidrio.^{ref(243)} No obstante, aún no se ha establecido la aplicación de la tubería de níquel para un amplio rango de compuestos biológicos. Hasta que esto ocurra, la tubería de vidrio puede seguir siendo el soporte principal para la realización de análisis clínicos.

Los diámetros internos de las columnas varían desde las columnas capilares (0.2 mm) hasta las empacadas de 4 mm. Las columnas empacadas de 4 mm de DI contienen cuatro veces la fase estacionaria de las columnas de 2 mm de DI de la misma longitud, y por lo tanto poseen mayor capacidad de muestra. No obstante, la misma separación requerirá mayores temperaturas y un tiempo mayor de análisis en la columna más ancha. Además, las columnas deben tener exclusivamente la longitud necesaria para efectuar la separación deseada. Una columna corta provee un tiempo corto de análisis, bajas temperaturas, larga vida de la columna, y menos ruido de fondo en el detector. Las columnas empacadas de 0.7 a 2 m (de 2



a 6 pies) o las columnas de apertura ancha de 15 m (45 pies) son suficientes para la mayoría de las separaciones químicas.

Compartimento térmico

El control preciso de la temperatura de la columna es imperativo en la cromatografía de gases. El horno de la columna es controlado por un sistema que es sensible a cambios de 0.01 grados Celsius y mantiene la temperatura de la columna en ± 0.1 Celsius de la temperatura deseada. El horno de la columna, el bloque de inyección, y los detectores deben tener los calentadores y controles separados. Los análisis pueden ser realizados a una temperatura constante del horno (isotérmica), o la temperatura puede ser variada durante el análisis (programación de temperatura). Se puede programar que el cambio de temperatura durante los análisis varíe con el tiempo de acuerdo a patrones predeterminados y reproducibles, que generan curvas lineales, convexas, o cóncavas cuando la temperatura de la columna se grafica contra el tiempo (Fig. 7-7). La programación de temperatura es a menudo utilizada en la separación de una mezcla compleja, cuyos componentes tienen una amplia variación en la afinidad por la fase estacionaria. Inicialmente se establece una baja temperatura de la columna para permitir la separación y elución de los compuestos con poca afinidad por la fase estacionaria. La temperatura es entonces aumentada para eluir los compuestos de alta afinidad por la fase estacionaria. Muchos cromatógrafos están equipados con controles especiales de los hornos, que elevan uniformemente la temperatura de la columna después de cada inyección de la muestra.

Detectores

A medida que el gas acarreador sale de la columna, un detector sensa los componentes separados de la muestra y genera una señal eléctrica correspondiente. Cualquier dispositivo físico que realice esto, puede ser utilizado como un detector; sin embargo, solo unos cuantos se utilizan comúnmente. Para una operación o respuesta óptima, cada tipo de detector requiere de un gas acarreador específico (Tabla 7-7). Los detectores de más amplio uso son discutidos en la siguiente sección. [refs\(244\)](#)

Detectores de conductividad térmica (DCT).

Un detector de conductividad térmica mide la diferencia en la capacidad para conducir el calor (conductividad térmica) entre el gas acarreador puro y la mezcla del acarreador con la muestra. Una muestra conducida en el gas aumenta la conductividad térmica. Usualmente están montados en un contenedor de acero inoxidable o de bronce cuatro elementos sensores de calor, termistores, o cables que se conectan para formar los brazos de un puente de Wheatstone (Fig. 7-8). Una corriente eléctrica pasa a través de los cables que componen el puente. Dos filamentos en los brazos opuestos del puente son enfriados por el gas acarreador (de referencia), y los otros dos por el efluente de la columna (muestra). El calor disipado sobre ambos juegos de conectores es balanceado ajustando la velocidad de flujo del gas acarreador puro. Los componentes que emergen de la columna aumentan la velocidad de enfriamiento de los conectores de la muestra, debido al aumento de la conductividad térmica de la mezcla gaseosa. Esto cambia la resistencia eléctrica del patrón de conectores de la



muestra, haciendo que se desequilibre el puente de Wheatstone. Este desbalance causa una respuesta en el registrador. Las variables importantes para una respuesta óptima del DCT son el gas acarreador, la velocidad de flujo, la corriente del filamento, y la temperatura del detector. Los DCTs carecen de selectividad porque cualquier compuesto que enfríe los conectores causará una respuesta. Ellos no son tan sensibles como otros detectores, con un rango mínimo de detección desde 0.1 a 0.5 mg del compuesto analizado por microlitro.

Detector de ionización de flama (DIF).

En un detector de ionización de flama, los compuestos eluidos en el gas acarreador son mezclados con hidrógeno y quemados en el aire para producir una flama muy caliente a fin de ionizar los compuestos orgánicos. Un par de electrodos, cargados por un voltaje polarizante, recoge los iones y genera una corriente proporcional al número de iones colectados. La corriente resultante es amplificada por un electrómetro, produciendo una respuesta sobre el registrador. La respuesta de un DIF es directamente proporcional al número de carbonos unidos al hidrógeno o a otros átomos de carbono en una molécula. Esta respuesta es insensible al agua, monóxido de carbono, dióxido de carbono, y la mayoría de los compuestos inorgánicos. El DIF es el detector más popular para la determinación de compuestos orgánicos. La sensibilidad depende de la estructura química; por lo tanto la respuesta del detector debe ser determinada para cada compuesto analizado. En condiciones óptimas la cantidad mínima detectable de un compuesto orgánico es de 1 ng. Una vista transversal de un detector de DIF es mostrada en la Fig. 7-9.

Detector de nitrógeno y fósforo (DNF).

Un detector de nitrógeno y fósforo es similar a un DIF, excepto que los iones del metal alcalino (rubidio) son introducidos en la flama de hidrógeno. Cuando un compuesto que contiene nitrógeno o fósforo es quemado en la flama, la velocidad de liberación del vapor del metal alcalino aumenta. El vapor del metal alcalino se ioniza fácilmente en la flama y aumenta el flujo de la corriente, resultando en un aumento en la sensibilidad para el nitrógeno y fósforo. La respuesta óptima depende principalmente del flujo de hidrógeno. La interacción selectiva de los iones del metal alcalino con estos compuestos es compleja y poco entendida. Así pues, la sensibilidad a los compuestos orgánicos de nitrógeno y fósforo y la escasa respuesta para otras moléculas orgánicas hacen al DNF muy conveniente para el análisis de las muestras biológicas. En condiciones óptimas, la cantidad mínima detectable de compuestos orgánicos nitrogenados es menor de 1 ng. En la Fig. 7-10 es mostrada una sección transversal del detector de DNF.

Detector de captura de electrones (DCE).

En un detector de captura de electrones (DCE), un isótopo radioactivo libera partículas beta que chocan con las moléculas del gas acarreador, produciendo muchos electrones de baja energía. Los electrones son colectados en electrodos, produciendo una *corriente estacionaria* pequeña y cuantificable. A medida que los componentes de la muestra que contienen grupos químicos con alta afinidad por electrones (especies electrofílicas), particularmente los átomos de halógeno, son eluidos de la columna, ellos capturan los electrones de baja energía generados por el isótopo para formar iones cargados negativamente. El detector mide la pérdida de corriente de la celda debido a la recombinación de los electrones. Se utilizan tres



técnicas para colectar los electrones: (1) corriente directa (CD), (2) método de pulso, y (3) método lineal. En el método de CD se aplica un voltaje constante a los electrodos de la celda, y los electrones son colectados continuamente para producir una corriente constante. La sensibilidad del método es menor que la de los otros métodos de DCE debido a que tanto los iones negativos como electrones libres son colectados por los electrodos. La reducción de la corriente es menor de lo que sería si sólo fueran colectados los electrones libres. En el método de pulso, se aplica un voltaje en pulsos continuos de corta duración; por lo tanto los iones negativos pesados no tienen tiempo para causar una respuesta, y solo los electrones libres son capturados. Entre los pulsos, la concentración de los electrones en el detector se incrementa hasta niveles que exceden los del método de CD. Consecuentemente el método de pulso tiene mayor sensibilidad. La CD y los métodos de pulso producen inherentemente una respuesta no lineal sobre un amplio rango de concentraciones de la muestra. Tal respuesta es atribuida a la cantidad finita de la radiación beta emitida por la fuente del detector por unidad de tiempo. Debido a que se mide una disminución en la corriente, una vez que una determinada concentración de los solutos eluidos este tipo de detector captura la mayoría de los electrones de baja energía disponibles. Solamente serán observados pequeños cambios en la corriente (respuesta del detector) al aumentar las concentraciones del soluto. El rango lineal es usualmente de 400 a 500 veces el límite de detección de un soluto para una fuente de tritio y 100 veces para una fuente de ^{63}Ni . Sin embargo, el método linealizado utiliza modificaciones electrónicas que operan el detector en la modalidad de pulso, de forma tal que se produce una corriente constante en la celda. Por consiguiente el rango lineal es expandido a intervalos de 10,000:1 para una fuente de ^{63}Ni . Las fuentes de partículas beta en un DCE son usualmente tritio ó ^{63}Ni . El DCE es el detector más sensible disponible, ya que se puede determinar hasta 1 picogramo del compuesto que contiene el halógeno. Los laboratorios que utilizan los detectores de captura de electrones deben tener licencia de la Comisión de Regulación Nuclear en los Estados Unidos y están sujetos a todas las regulaciones concernientes a la seguridad de los empleados y a la contaminación ambiental dictadas públicamente por la comisión.

Espectrómetro de masas (EM) usado como detector.

El espectrómetro de masas es un detector cromatográfico especializado que provee una detección extremadamente sensible (en el orden de picogramos) y una identificación específica del compuesto analizado. El cromatógrafo de gases y el espectrómetro de masas son presentados en el Capítulo 8.

Espectrofotómetro de infrarrojo con transformadas de Fourier (IRTF)

El detector IRTF obtiene el espectro infrarrojo de un compuesto a medida que éste eluye de la columna del cromatógrafo de gas. El formato de reporte de los detectores del IRTF es similar al de los detectores por espectrometría de masas (Capítulo 8). Un sistema CG/IRTF produce cromatogramas medidos en bandas específicas de infrarrojo (IR) similares a las del sistema CG/EM, o bien registra todo el espectro IR del compuesto de igual manera que el EM registra el espectro de masas de un compuesto. Recientes avances en detectores de fotones de IR de rango angosto y fotoceldas de muestra le dan al CG/IRTF una sensibilidad y especificidad que compite con la del CG/EM.[ref\(245\)](#) Hay dos tipos de interfase para adaptar el cromatógrafo de gases al detector de IRTF: “fase de vapor” y “deposición criogénica”. En la

367



fase de vapor, una línea de sílica fundida que se calienta, dirige el efluente de CG a través de una angosta y larga celda de gas infrarroja conocida como “tubo de luz”. Un haz de IR se transmite a través del tubo de luz, el cual está sellado en cada extremo con ventanas transparentes al IR. En La deposición criogénica, el efluente de la columna es dirigido hacia una cámara de vacío (10^{-5} torr) que termina con un tope de sílica fundida instalado. por encima de una placa de ZnSe transparente al IR. El efluente es depositado sobre la placa, la cual es mantenida a temperaturas del nitrógeno líquido. La lámina con el eluyente congelado está continuamente expuesto al haz de IR.

Ambos métodos colectan continuamente el espectro IR de los compuestos eluidos. El detector no destruye al compuesto, y el efluente destinado para el IRTF puede ser dirigido a otros sistemas detectores como el EM (CG/IRTF/EM). Este último sistema, es una técnica de identificación extremadamente poderosa. En el presente el CG/IRTF no se aplica rutinariamente en los laboratorios de química clínica; sin embargo, ésta ganando popularidad en los laboratorios de toxicología forense.[ref\(246\)](#)

Registro de datos.

Los registradores gráficos son los aparatos más comunes de lectura de datos en cromatografía de gases. La sensibilidad del registrador es usualmente de 1 a 10 mV, con una respuesta de escala completa de 1 segundo o menos. Las determinaciones cuantitativas de los compuestos separados son realizadas de dos maneras: mediciones de altura del pico o área del pico. Tanto la altura como el área de pico de la respuesta del detector a la muestra en el efluente, son proporcionales a su concentración. Las mediciones de la altura del pico son útiles en análisis repetitivos que son realizados por el mismo operador en un sistema fijo que requiere una calibración extensa, o que solo resuelve parcialmente los compuestos, haciendo difíciles las determinaciones de área del pico. En general las medidas de área del pico son más precisas. El área del pico puede ser determinada por métodos manuales o automatizados. La integración electrónica del área del pico produce mediciones más precisas y exactas. Hoy en día, los detectores pueden ser conectados a unidades microprocesadoras o a un sistema de datos computarizados que automáticamente registra la respuesta, identifica los componentes de la muestra, integra las señales, realiza los cálculos, almacena todos los datos, e imprime los resultados analíticos en su formato final.

Aplicaciones de la CG en la Química Clínica

La CG es una metodología analítica extremadamente y poderosa. Numerosos componentes de la muestra pueden ser simultáneamente separados, identificados, y cuantificados. Al elegir la fase estacionaria apropiada, uno puede analizar cualquier mezcla de compuestos que se puedan vaporizar o convertir en derivados volátiles. Se puede adicionar una alta sensibilidad y selectividad mediante la elección de los detectores. Todavía, a pesar de estas ventajas, la aplicación de la CG en la mayoría de los laboratorios de bioquímica clínica está limitada a unas cuantas áreas especiales de pruebas: monitoreo de fármacos terapéuticos (MFT), toxicología, y ensayos para errores innatos del metabolismo. Aún en estas áreas, la CG es aplicada en pruebas especiales en pocos laboratorios debido a la capacitación especializada requerida para el mantenimiento del equipo. La CG es utilizada para realizar los

análisis de MFT de drogas psicoactivas, particularmente aquellas que dan lugar a metabolitos activos, los cuales pueden ser medidos junto con el compuesto original.

La determinación de drogas o compuestos tóxicos ofrece un amplio potencial para el uso de la CG en el laboratorio clínico debido a que proporciona un método rápido, simple, y confiable para las determinaciones simultáneas de agentes tóxicos volátiles como el metanol, etanol, isopropanol, acetona, y acetaldehído. La CG acoplada a la espectrometría de masas es necesaria para las pruebas de drogas de abuso en orina reguladas por las agencias gubernamentales, como el Departamento de Defensa, el Departamento de Transporte, y la Agencia de Regulación Nuclear. Los laboratorios que llevan a cabo estos ensayos deben estar certificados por el Departamento de Salud y Servicios Humanos. Hasta ahora, han sido acreditados alrededor de 80 laboratorios, algunos asociados con laboratorios clínicos.

La CG es aplicada en ramas altamente especializada de química clínica como son las pruebas para errores innatos del metabolismo. Los defectos hereditarios en el metabolismo dan lugar a la acumulación de cantidades inapropiadas de ácidos orgánicos y otros coproductos del metabolismo en el suero y en la orina. La determinación de ácidos orgánicos y sus concentraciones en orina o suero son una herramienta valiosa para el manejo de estas raras enfermedades.[ref\(247\)](#) Los perfiles de aciduria son fácilmente obtenidos con CG/FID, mientras que los perfiles de suero requieren de métodos de CG/SM con mayor especificidad y sensibilidad. Actualmente, estas pruebas son realizadas solo en laboratorios comerciales de referencia o en centros médicos universitarios.

Referencias

1. Willett J, Kealey D: *Gas chromatography*, New York, 1987, Wiley & Sons.
2. Grob RL: *Modern practice of gas chromatography*, ed 2, New York, 1985, Wiley & Sons.
3. Freeman RR: *High resolution gas chromatography*, ed 2, Palo Alto, Calif., 1981, Hewlett-Packard Co.
4. Schomburg F: *Gas chromatography, a practical course*, Weinheim, Germany, 1990, VCH Publishers.
5. Delley R, Friedrich K: System CG72 von bevorzugten Trennflüssigkeiten für die Gas-chromatographie, *Chromatographia* 10: 593-598, 1971.
6. Hawkes S, Grossman D, Hartkopf A, et al: Preferred stationary liquids for gas chromatography, *J Chromatogr Sci* 13:115-117, 1975.
7. Siggia S: *Instrumental methods of organic functional group analysis*, New York, 1972, Wiley & Sons.
8. Ahuja S: Derivatization in gas chromatography, *J Pharm Sci* 65:163, 1976.
9. Kovats E: The Kovats' retention index system, *Anal Chem* 36:31A, 1964.
10. Lorenz LJ, Roger LB: Specification of gas chromatographic behavior using Kovats' indices and Rohrschneider constants, *Anal Chem* 43:1593-1599, 1971.
11. American Society for Testing and Materials: *Gas chromatographic data compilation catalog AMD 25A*, Philadelphia, Penn., 1967, ASTM.
12. American Society for Testing and Materials: *Gas chromatographic data compilation catalog, suppl 25A S-1*, Philadelphia, Penn., 1971, ASTM.
13. Perrigo BJ, Peel HW: The use of retention indices and temperature-programmed gas chromatography in analytical toxicology, *J Chromatogr Sci* 19:219-226, 1981.
14. Japp M, Gill R, Osselton MD: Comparison of drug retention indices determined on packed, wide bore capillary and narrow bore capillary columns, *J Forensic Sci* 32:1574-1586, 1987.
15. Supina WR, Rose LP: The use of Rohrschneider constants for classification of GLC columns, *J Chromatogr Sci* 8:217-217, 1970.



16. McReynolds WO: Characterization of some liquid phases, *J Chromatogr Sci* 8:685-691, 1970.
17. Ettre LS: Basic relationships of gas chromatography, ed 2, Norwalk, Conn., 1979, Perkin-Elmer Corp.
18. Fenimore DC, Whitford JJ, Davis CM, Zlatkis A: Nickel gas chromatographic columns: an alternative to glass for biological samples, *J Chromatogr* 140:9-16, 1977.
19. David DJ: *Gas chromatographic detectors*, New York, 1974, Wiley & Sons.
20. Sevcik J: *Detectors in gas chromatography*, New York, 1975, Elsevier/North-Holland.
21. Bourne S, Hefner AM, Norton KL, Griffiths PR: Performance characteristics of a real-time direct deposition gas chromatography/Fourier transform infrared spectrometry system, *Anal Chem* 62:2448-2452, 1990.
22. Kalasinsky KS, Levine B, Smith ML: Feasibility of using GC/FTIR for drug analysis in the forensic toxicology laboratory, *J Anal Toxicol* 16:332-336, 1991.
23. Forman DT: Role of the laboratory in diagnosis of organic acidurias, *Ann Clin Lab Sci* 21:85-93, 1991

Tablas

Tabla 7-1. Diferencias entre columnas empacadas y columnas capilares:

Parametro	Paquete	Capilar
Longitud, metros	1.5 – 6.0	5 – 100
Diámetro interno, milímetros	2 – 4	0.2 – 0.7
Permeabilidad específica, (10 ⁷)cm ²	1 – 10	10 – 1000
Flujo, mL / min	10 – 60	0.5 – 15.0
Caída de presión, psi	10 – 40	3 – 40
Platos efectivos totales (2 metros, 50 metros)	5000	150,000
Platos efectivos por metro	2500 (DI 2 mm)	3000 (DI 0.25)
Capacidad	10 µg / pico	<50 ng / pico
Espesor de la película líquida (lgmm)	1 – 10	0.05 – 0.5

Tabla 7-2. Conductores de gas comunes.

Gas	Peso molecular	Densidad (g/L)	Impurezas (ppm)
Argón	39.944	1.784	–
Helio	2.007	0.177	Hidrocarburos (1–100)
Hidrógeno	2.018	0.089	–
Nitrógeno	28.014	1.251	Oxígeno (20)

Tabla 7-3 Ejemplos de fases estacionarias comúnmente usadas y sus aplicaciones

Fase estacionaria	Estructuras	Actividad	Temperatura (°C min/máx)	Aplicación	Compuestos específicos
Silicona OV-1 (100% metilo)	$\left[\begin{array}{c} \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \\ \quad \\ -\text{O}-\text{Si}-\text{O}-\text{Si}-\text{O}- \\ \quad \\ \text{R} \quad \text{R}' \end{array} \right]_n$	No-polar	100/350	Bacterias, drogas	Ésteres, metílicos de ácidos grasos, benzodiazepinas
Silicona OV-17 (50% fenol)	R y R' = CH ₃ en la estructura arriba R y R' = Fenilo en la estructura arriba	Polaridad intermedia	20/350	Drogas esteroides	Antidepresivos tricíclicos, barbituratos, colesterol
Silicona OV-210 (50%, 3,3,3, - trifluoropropilo)	R y R' = -CH ₂ -CH ₂ -CF ₃ en la estructura arriba	Polar	20/300	Drogas pesticidas	Drogas básicas, lindano, aldrín, DDT
Silicona OV-225 (25% cianopropilo, 25% fenol)	R = Fenol, R' = -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CN en la estructura arriba	Polar	20/275	Esteroides	Derivados TMS de 17-cetosteroides
10% Apiezon L/2% KOH	Mezcla indefinida de hidrocarburos de elevado punto de ebulición	No-polar	50/225	Aminas	Anfetaminas
NPGS (succinato de neopentilglicol)	$\left[\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_2-\text{C}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{O}- \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} \right]_n$		50/240	Ácidos grasos volátiles	Ácido acético hasta caproico
Carbopack B/5%	$-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-$	Polar		Alcoholes, aldehídos, cetonas	Metanol, etanol, acetaldehído, acetona
DEGS (succinato de dietilenglicol)	$-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{O})_n-$	Polar	20/200	Bacterias	Ésteres metílicos de ácidos grasos
EGA (adipato de etilenglicol)	$-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{O})_n-$		100/210	Aminoácidos	NBTFA* derivados de aminoácidos
Chromosorb 102 (polímero de estireno y divinilbenzeno)	$-(\text{CH}=\text{C}-\text{CH}=\text{CH}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}=\text{CH})_n-$		< 250° C	Alcoholes, aldehídos	Metanol, etanol, acetaldehído
Porapak Q (mezcla de polímeros de etilvinilbenzeno + divinilbenzeno)	$-(\text{CH}_2=\text{CH}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}=\text{CH})_n-$		< 250° C	Bajo peso molecular	Hidrocarburos clorados

*NBTFA, ácido graso de nitroazul de tetrazolio.

TABLA 7-4. Datos utilizados para el cálculo del índice de retención.



Compuesto	Hexano
Átomos de carbono	6
Símbolo	z
tR (min)	14.96
log tR (min)	1.175
Índice de retención (I)	600 (por definición)
Compuesto	Benceno
Átomos de carbono	6
Símbolo	x
tR (min)	16.86
log tR (min)	1.227
Índice de retención (I)	650 (por experimentación)
Compuesto	Heptano
Átomos de carbono	7
Símbolo	z + 1
tR (min)	19.01
log tR (min)	1.279
Índice de retención (I)	700 (por definición)
Compuesto	Octano
Átomos de carbono	8
Símbolo	—
tR (min)	24.15
log tR (min)	—
Índice de retención (I)	800 (por definición)
Compuesto	Nonano
Átomos de carbono	9
Símbolo	—
tR (min)	30.76
log tR (min)	—
Índice de retención (I)	900 (por definición)



Índice de Retención (I*) 500 (por definición)

Tabla 7-5. Compuestos de Referencia Utilizados para Determinar la Constante de McReynolds.

orgánico			Compuesto
visualizar			esperado para
Compuesto			un
comportamiento			
de referencia	Abreviación	I*	similar en la fase
líquida			
Benceno	X'	650	Aromáticos, olefinas
Butanol	Y'	590	Alcoholes, fenoles,
ácidos			
débiles			
2-Pentanona	Z'	627	Aldehídos, ésteres,
cetonas			
Nitropropano	U'	652	Compuestos
nitrogenados y			
nitrilos			
Piridina	S'	699	Aromáticos
nitrogenados			
bases			heterocíclicos,
* Valor absoluto de índices de retención observados en el escualeno			

Tabla 7-6. Constante de McReynolds de varias fases líquidas.

Fase líquida	Constante de McReynolds				
	X'	Y'	Z'	U'	S'
DEGS		496	746	590	837
835					
Carbowax 20M		322	536	368	572
510					
Emulphor ON-870		202	395	251	395
344					
Triton X-100		203	399	268	402
362					



XE – 60	204	381	340	493
367				
<i>X'</i> , Benceno; <i>Y'</i> , Butanol; <i>Z'</i> , 2-Pentano; <i>U'</i> , Nitropropano; <i>S'</i> , Piridina. Los números en negritas son las constantes de McReynolds que son mucho mayores para DGS que para Carbowax 20M.				

Tabla 7-7. Detectores y gases apropiados.

Detector Detector de gas	Conductor de gas	
Conductividad térmica	Helio, hidrógeno	
– (DCT)		
Ionización de llama	Helio, nitrógeno	Aire e
hidrógeno (DIL)		
Nitrógeno-fósforo	Helio, nitrógeno	1. Aire
e hidrógeno (DNF)		2. Aire
y 8% hidrógeno		en
helio		
Captura de electrones	Nitrógeno	5%
metano en argón	5% metano en argón	
–		

Figuras

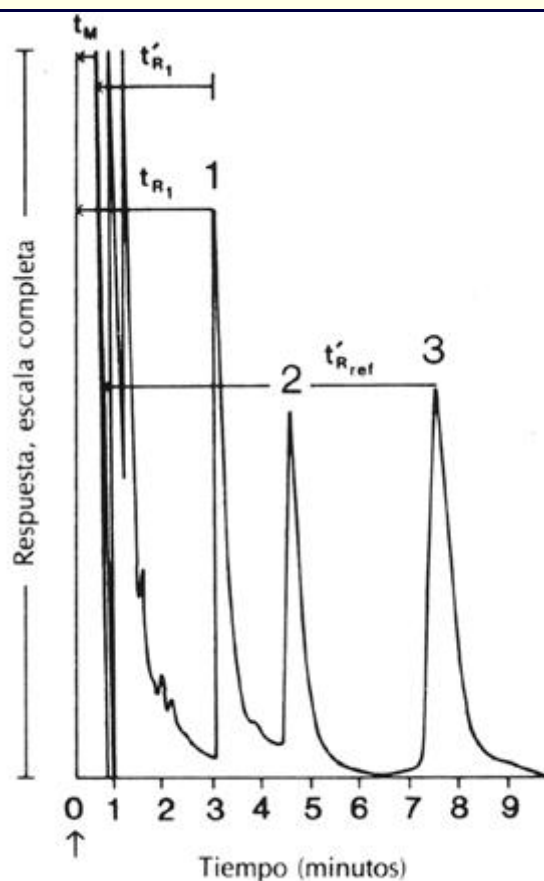


Figura 7-1 Ejemplo de un cromatograma de gases mostrando la respuesta contra el tiempo. La flecha vertical (tiempo = 0) indica el tiempo de inyección, y el pico inicial es el “tiempo muerto”, t_M . t_R designa el tiempo de retención incorrecto, mientras el t_R es corregido el tiempo de retención. T'_{Rref} es corregido el tiempo de retención para el estándar interno o compuesto de referencia. Tiempos relativos de retención para el pico 1 : $r = t_{R1}' / t'_{Rref}$. (Modificado de: Mackell MA, Poklis A : *J Chromatogr* 235 (2) : 445, 1982).

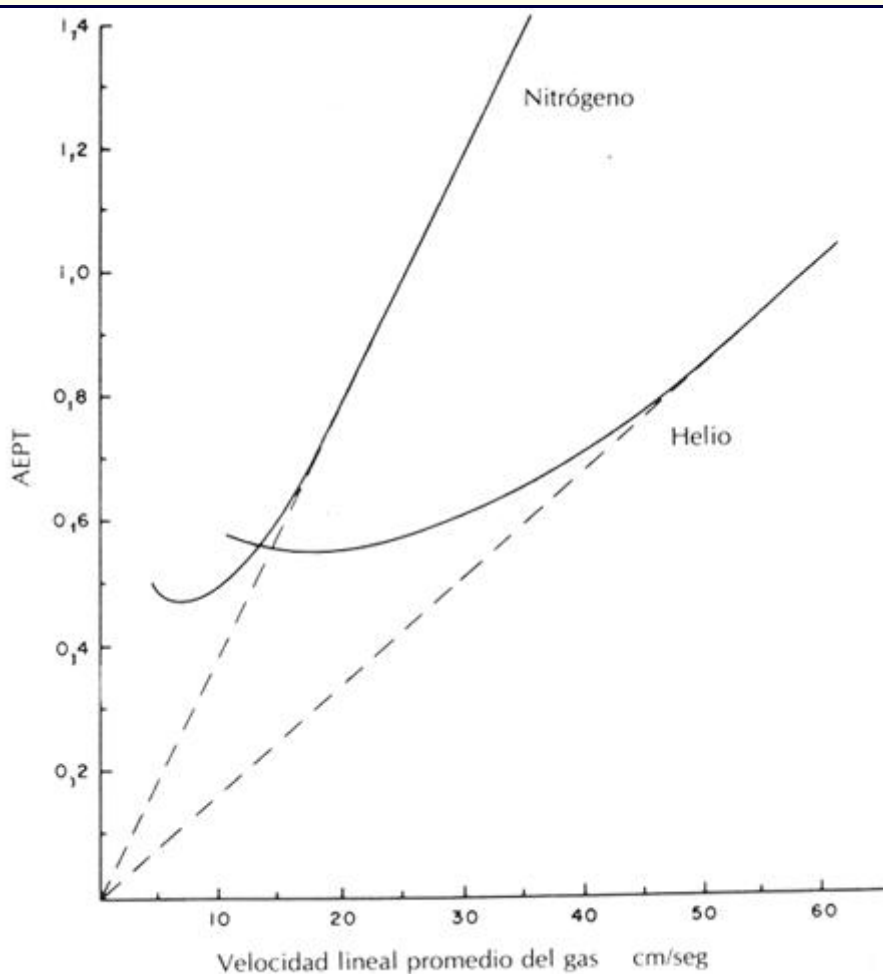


Figura 7-2 Relación entre AETP (altura equivalente de un plato teórico) y promedio de la velocidad lineal del gas para dos diferentes conductores de gas: nitrógeno y helio. (De: Ettre LS: *Practical Gas Chromatography*, Norwalk, Conn, 1973, Perkin – Elmer Corp)

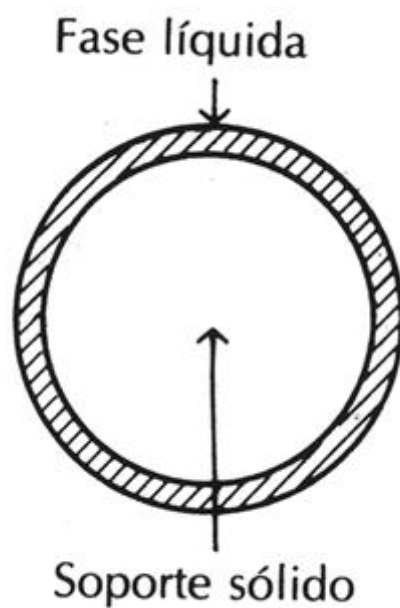


Figura 7-3 Esquema de la partícula de soporte sólido para cromatografía de gas con revestimiento de la fase estacionaria líquida.

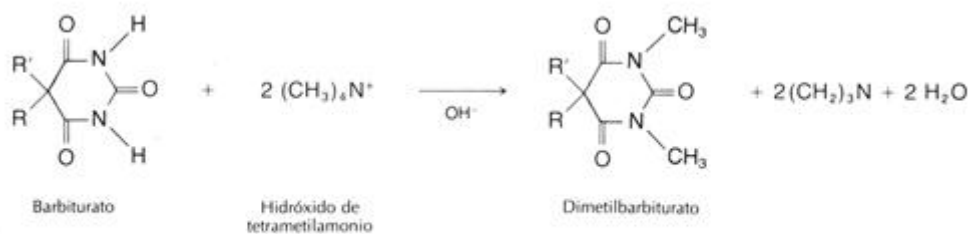


Fig. 6-6. Derivatización de barbitúricos por tetrametilación.

Figura 7-4 Obtención de derivados tetrametílicos de compuestos barbitúricos.

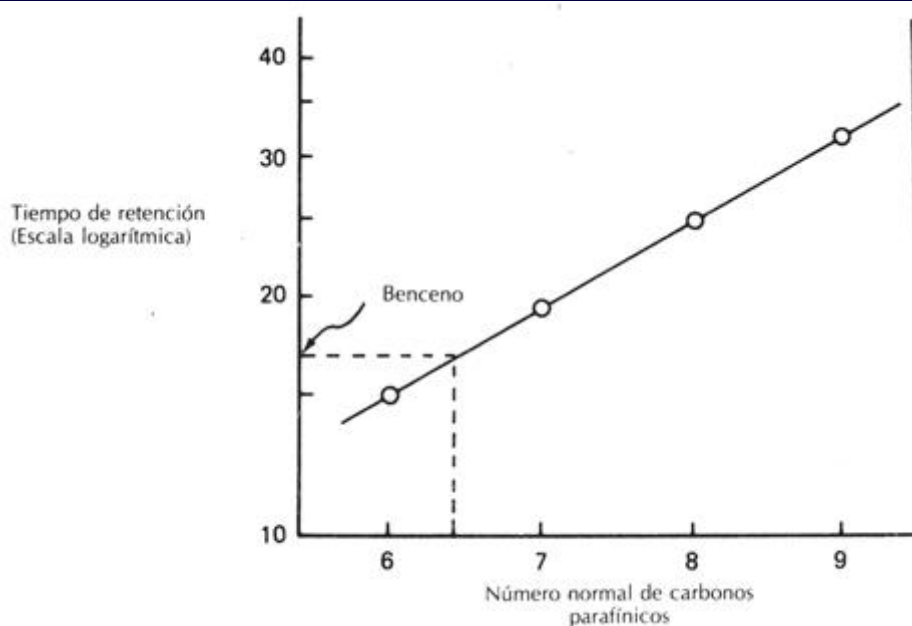


Figura 7-5 Relación lineal entre el logaritmo del tiempo de retención y el número de átomos de carbono en una serie de hidrocarburos parafínicos. (De: Rowland FW: *The Practice of Gas Chromatography*, Palo Alto, Calif., 1974, Hewlett-Packard Co)

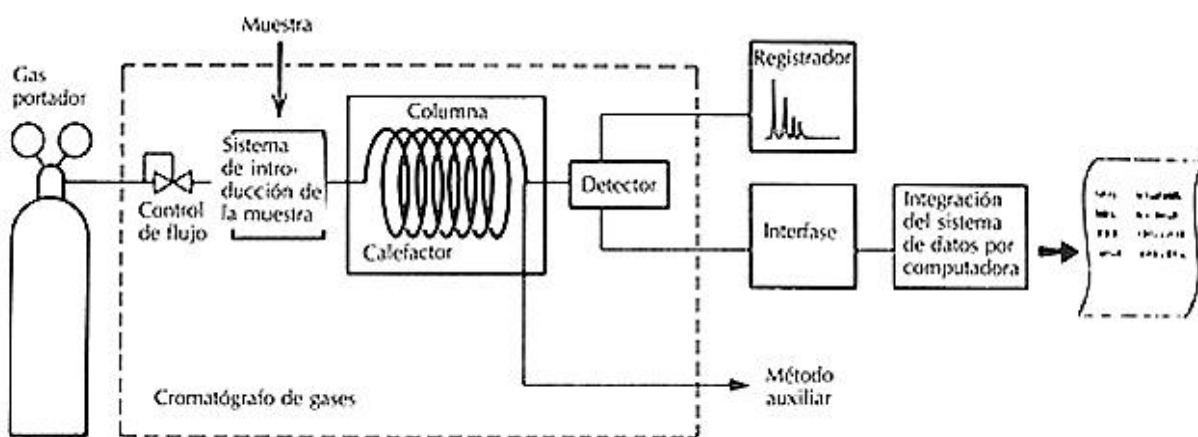


Fig. 6-8. Componentes básicos de un sistema de cromatografía gaseosa.²

Figura 7-6 Componentes básicos de un sistema de Cromatografía de Gas. (De: Ettre LS : *Practical Gas Chromatography*, Norwalk, com, 1973, Perkin – Elmer Corp.)

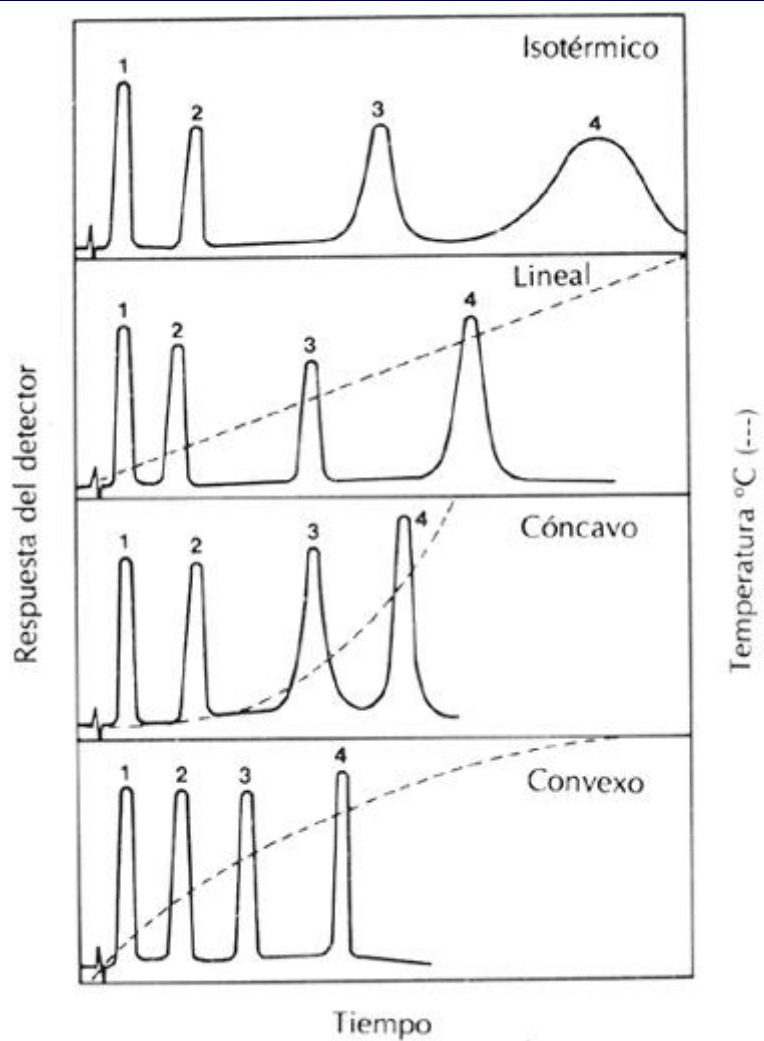


Figura 7-7 Esquema de la separación teórica de cuatro compuestos mostrando patrones variables de elución con diferentes programas de temperatura.

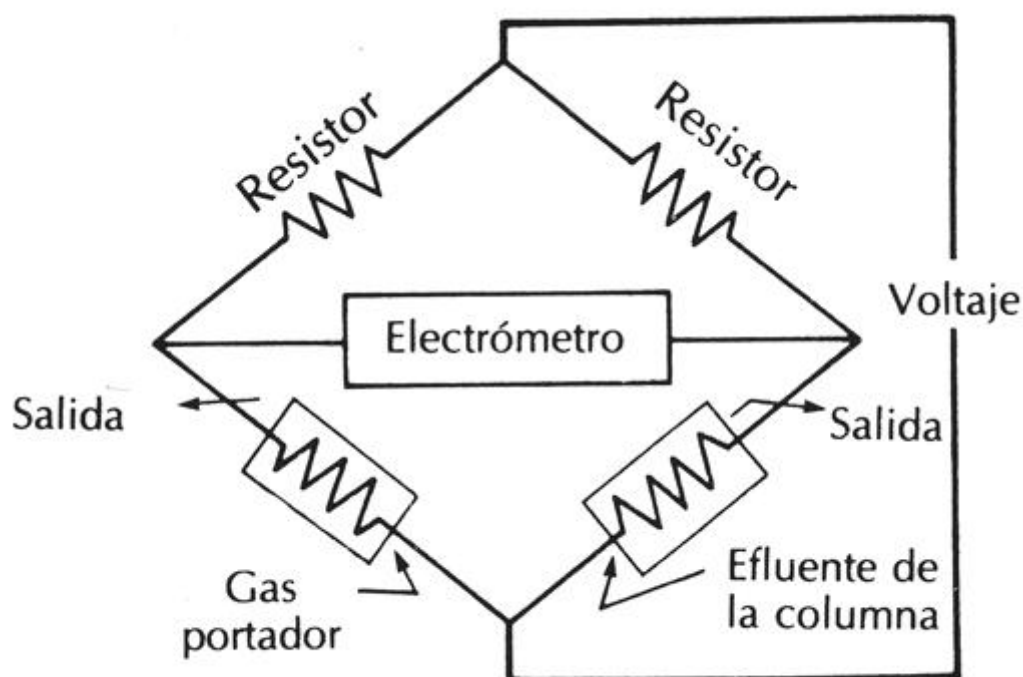


Figura 7-8 Esquema del detector de conductividad térmica. (De: Werner M, Mohrbacher RJ, Riendeau CJ: In Baer DM, Dito WR : *Interpretation of therapeutic drug levels*, Chicago, 1981, American Society of Clinical Pathology)

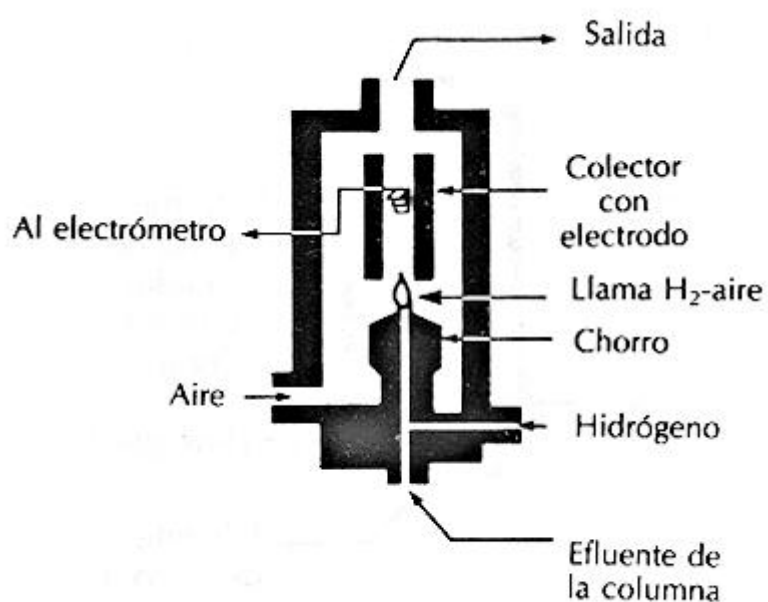


Figura 7-9 Esquema del detector de ionización de llama. (De: Werner M, Mohrbacher

RJ, Riendeau CJ: In Baer DM, Dito WR: *Interpretation of therapeutic drug levels*, Chicago, 1981, American Society of Clinical Pathology)

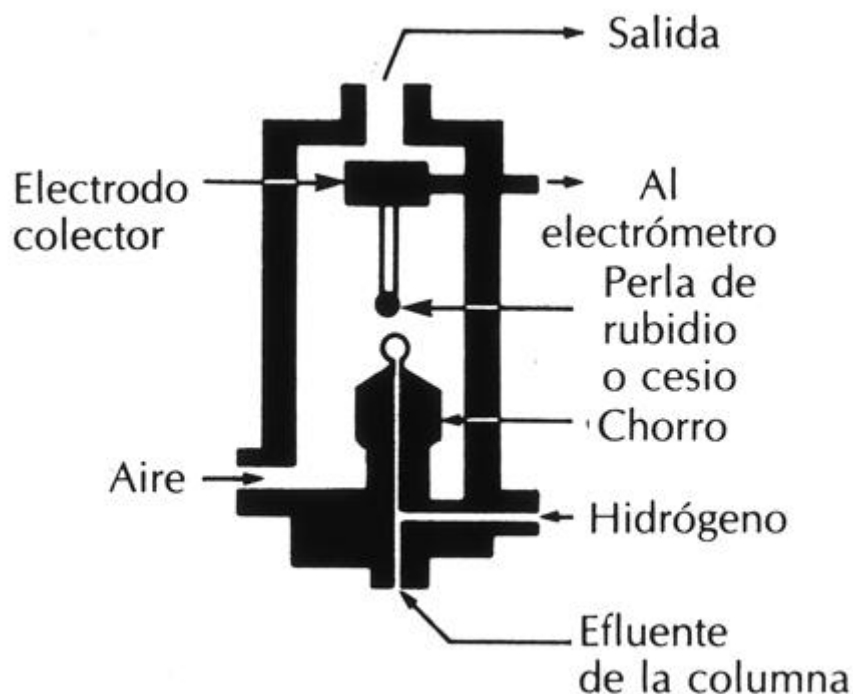


Figura 7-10 Esquema del detector de llama de metal alcalino. (De: Werner M, Mohrbacher RJ, Riendeau CJ: In Baer DM, Dito WR : *Interpretation of therapeutic drug levels*, Chicago, 1981, American Society of Clinical Pathology)

CAPÍTULO 8

8. Espectrometría de Masas

Michael Lehrer

Principios Básicos

Espectrómetro de masas

Cámara de ionización

Filtro de masas

Detectores

Computadoras



Formación de fragmentos iónicos

Ionización electrónica (IE)

Ionización química (IQ)

Fragmentación de masa

Comparación entre las ionizaciones electrónica y química.

Uso del espectrómetro de masas

Análisis de barrido total

Monitoreo de ion seleccionado

Cuantificación

Técnicas de separación

Cromatografía de gases/espectrometría de masas

Cromatografía de líquidos/espectrometría de masas

Sondas sólidas

Otros espectrómetros de masas

Detectores de atrapadores iónicos (DTI)

Espectrometría de tiempo de vuelo

Espectrometría de masas en tándem (EM/EM).

Determinación forense de fármacos.

Objetivos.

- Definir los conceptos de masa, carga y fragmentación de masa de las moléculas.
- Describir los componentes básicos del espectrómetro de masas.
- Establecer como se usan una cámara de ionización y un filtro de masas para separar iones.
- Describir los elementos esenciales de un patrón de fragmentación de masa.
- Establecer los principios de cómo el patrón de fragmentación de masa se usa para identificar moléculas.

Términos clave

barrido total En la espectrometría de masas, secuencia de barrido donde todos los iones en el rango de interés son detectados.

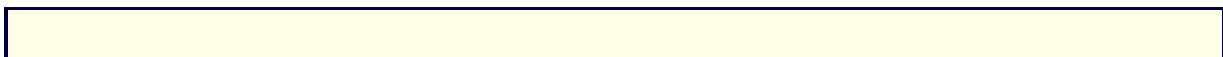
cámara de ionización Área dentro del espectrómetro de masas en que las moléculas son ionizadas por un haz de electrones.

CG/EM Técnica que emplea el acoplamiento de un cromatógrafo de gases con un espectrómetro de masas.

CL/EM Cromatógrafo de líquidos (CL) combinado con un espectrómetro de masas (EM).

corriente iónica total (CIT) Integración y representación cromatográfica de corrientes iónicas en aplicaciones de CG/EM.

cuadrupolo Tipo de analizador del espectrómetro de masas que separa los fragmentos iónicos



según su desviación al pasar por un campo eléctrico.

cuadrupolo de triple etapa (CTE) Configuración instrumental de un sistema EM/EM en cuadrupolo.

descomposición unimolecular Desintegración de alta energía de un ion en fragmentos iónicos más pequeños.

detector de trampa iónica (DTI) Espectrómetro de masas que opera sobre el principio de la acumulación de iones en el tiempo.

dilución isotópica Técnica para la cuantificación de productos químicos que difieren en su composición solamente por los isótopos.

espectrometría de masas en tandem (EM/EM) Técnica que emplea el acoplamiento de dos o más analizadores.

espectro de masas Registro de un espectrómetro de masas que representa la relación masa/carga (m/z) contra la intensidad del fragmento iónico.

espectrómetro de masas de tiempo de vuelo (TDV) Espectrómetro que separa los fragmentos iónicos según su tiempo de tránsito por una trayectoria dada.

filtro de masas Dispositivo electrónico o magnético que identifica los iones según su relación masa/carga en el espectro de masas.

fragmentación de masa Ruptura de un ion molecular grande inestable, normalmente ocurre de acuerdo a un patrón distintivo específico de esa molécula.

huellas digitales Patrones de fragmentación característicos de los compuestos orgánicos.

Instituto Nacional de Drogas de Abuso Agencia gubernamental de Estados Unidos responsable de la regulación y la certificación de los laboratorios de ensayo de drogas de abuso forenses. Su acrónimo en inglés es NIDA.

ion molecular (M^+) Fragmento iónico inicial correspondiente a la masa molecular del compuesto.

ion cuasimolecular Fragmento iónico formado frecuentemente en la ionización química por la transferencia de un protón, correspondiente al peso molecular más uno.

iones hijas La salida de iones del analizador del segundo espectrómetro de masas en un sistema EM/EM.

ion madre Ion salido del primer espectrómetro de masas en un sistema EM/EM.

ionización blanda Técnica que utiliza baja energía de ionización, por ejemplo la ionización química

ionización electrónica (IE) Bombardeo de electrones con alta energía que transforma las moléculas en fragmentos iónicos.

ionización química de ion negativo (IQIN) Técnica de ionización química dirigida a la generación de iones con carga negativa.

masa molecular Masa molecular total de una molécula.

monitoreo de ion seleccionado (MIS) Es el barrido en el detector de unos pocos fragmentos iónicos preseleccionados.

nebulizador iónico Es una variación de la técnica del "termspray" usada para introducir el líquido cromatográfico efluente en la fuente de iones del espectrómetro de masas a temperatura ambiente.

patrón de fragmentación Representación de la intensidad de los fragmentos iónicos contra la relación masa-carga.



perfil iónico selectivo Barrido selectivo e integración del área en el modo MIS de un fragmento iónico significativo.

pico base Es el pico más intenso en el espectro de masas.

potencial de ionización Es la cantidad de energía requerida para desplazar un electrón de la capa exterior de un compuesto.

reacción ion-molécula Es el producto del impacto de un fragmento iónico con una molécula intacta en la cámara de ionización.

relación masa/carga (m/z) Es la relación de la masa de un fragmento iónico dado dividida por su carga iónica.

sector magnético Parte del espectrómetro de masas que separa los fragmentos de iones según su desviación al pasar por un campo magnético.

sonda de sólidos Sonda utilizada para introducir directamente material cristalino en el espectrómetro de masas.

termospray Una técnica utilizada para introducir el efluente de la cromatografía de líquidos en la cámara de ionización del espectrómetro de masas.

voltaje de aceleración Diferencia de potencial en la cámara de ionización que ayuda a impulsar los fragmentos iónicos cargados hacia el detector.

Principios Básicos

La espectrometría de masas emplea la formación y análisis de iones para el estudio de una amplia variedad de moléculas. Los espectrómetros de masas son instrumentos que operan según el principio de que las partículas cargadas que se mueven a través de un campo eléctrico o magnético se pueden separar de otras partículas cargadas de acuerdo a sus relaciones masa-carga (m/z). Como las moléculas no tienen carga neta, en los espectrómetros de masas esta carga se les induce mediante un proceso de ionización. Las moléculas cargadas no son estables y se pueden fragmentar y perder la carga al interactuar con otras superficies o moléculas. En el uso del espectrómetro de masas se asume implícitamente que los productos ionizados (incluyendo los fragmentados) se forman de manera reproducible si se mantienen constantes las condiciones en los sistemas de separación iónica y detección.

Cada uno de los iones resultantes tiene una carga y masa molecular específicas, que el espectrómetro de masas separa y detecta. Como la masa de cada ion es discreta en más de una milésima de la unidad de masa atómica, la separación resultante de las masas iónicas se presenta en forma de líneas espectrales de intensidad contra la relación de masa-carga. La intensidad de cada línea está en proporción al número de iones de ese tipo que alcanzan el detector.

La mayoría de los iones tienen una sola unidad de carga; por lo que usualmente se les define sólo en términos de “masa”. Sin embargo, pueden aparecer iones doblemente cargados que tendrán un valor de masa de la mitad de su verdadero valor espectrométrico total. El valor m/z para cada ion se grafica en el eje x y la intensidad del ion en el eje y , formando una gráfica de líneas (Fig. 8-1). Al registro del ion más intenso en el espectro se denomina *pico base* y se le asigna arbitrariamente el valor del 100% de la abundancia. La intensidad de otros picos se normaliza por la intensidad del pico base. El registro de todos los iones formados y la abundancia relativa de cada uno constituyen el espectro de masas del compuesto. Este patrón único de fragmentación de la molécula es reproducible, y se puede lograr la identificación de



las muestras al comparar los valores iónicos e intensidades de un compuesto desconocido contra un espectro de referencia. La identificación química del compuesto desconocido se obtiene al confrontar ambos espectros.

Espectrómetro de Masas

Todos los espectrómetros de masas tienen un sistema para hacer y mantener el vacío; un dispositivo para la introducción de muestras (como el cromatógrafo líquido-gaseoso, CLG; cromatógrafo líquido, CL; y sondas de sólidos); una cámara de ionización, que sirve para ionizar la muestra; un filtro de masas o analizador donde las partículas cargadas son separadas de acuerdo a sus relaciones m/z ; y dispositivos para la recolección, amplificación, y detección de iones (Fig. 8-2). Los espectrómetros de masas modernos incorporan también sistemas computarizados para el control del instrumento y la adquisición, presentación, manipulación, e interpretación de los datos.

Cámara de ionización.

La cámara de ionización se mantiene en un medio de alto vacío para incrementar la eficiencia de las colisiones y la formación de iones. Bombas de vacío de alta eficiencia mantienen la presión de la cámara de ionización en el rango de 10^{-5} a 10^{-7} torr, lo que no sólo minimiza las reacciones ion-molécula (que complicarían el análisis), sino que también optimiza la separación, transmisión, y detección de los iones generados.

Los iones se generan en la cámara de ionización del espectrómetro de masas (Fig. 8-3). La fuente se puede ver como una pequeña caja cerrada conteniendo algunos orificios pequeños a modo de entradas y salidas. En unas superficies metálicas específicas son inducidas diferencias de potencial variable, positivas y negativas. Hacia esta cámara se dirige un haz de electrones. Los compuestos que se someten al análisis entran y son bombardeados por el haz de ionización operando a 70 eV (valor por convención). Algunos de los compuestos se convierten en iones positivos y negativos, y esos iones son atraídos o repelidos por los potenciales eléctricos; las cargas opuestas se atraen mutuamente, las de igual signo se repelen. Según la disposición de la diferencia de potencial, se optimiza la preservación de iones de una polaridad dada (sean positivos o negativos). Por ejemplo, el potencial negativo mantiene los iones positivos en movimiento dentro del volumen definido por la cámara iónica. Si un ion hace contacto físico con la superficie metálica, es neutralizado y eliminado inmediatamente. Manipulando la magnitud y polaridad de las diferencias de potencial, los iones dentro de la cámara pueden ser conservados, acelerados y dirigidos en el espacio hacia los orificios que conducen al filtro de masas.

Filtro de masas.

Separación electrónica.

El filtro de masas separa los iones de interés de acuerdo a sus relaciones m/z permitiéndoles finalmente llegar al detector. La separación de los iones en el filtro de masas se puede hacer electrónicamente, como en el caso del espectrómetro de masas con analizador de

cuadrupolo. Un filtro cuadrupolo consiste en un cuadrante de cuatro varillas paralelas - hiperbólicas o circulares - que crea un campo de radiofrecuencias específico (Fig. 8-4). Se conectan eléctricamente las varillas en oposición geométrica. El voltaje aplicado tiene una componente directa U y una componente alterna $V0(\cos wt)$. $w = 2\pi f$, donde f es el valor de la radiofrecuencia.[ref\(248\)](#) La diferencia de potencial entre los dos pares de varillas es entonces $U + V0 \cos wt$. Esto crea un campo oscilatorio característico, en que oscilarán los iones positivos inyectados en la región del cuadrupolo entre los electrodos adyacentes de polaridad opuesta. A una radiofrecuencia específica, los iones de una masa determinada oscilan con una amplitud estable entre los electrodos. En el interior del campo del cuadrupolo no se ejerce fuerza en dirección longitudinal por lo que el ion con oscilaciones estables continúa por su trayectoria hacia el detector, viajando a su velocidad inicial. Durante su período de vuelo con un potencial de aceleración de 5 a 30 voltios, el ion oscila suficientemente para producir una separación de masas razonable. La amplitud de las oscilaciones de los iones de mayor o menor masa se va incrementando hasta que estos alcanzan los electrodos del cuadrupolo y son neutralizados.

Separación magnética.

En otra variante, el filtro de masas puede separar magnéticamente los iones, como en el caso de los espectrómetros de masas de sector magnético. Los iones formados en la cámara son impulsados hacia un campo magnético homogéneo (Fig. 8-5). Para iones con una carga electrónica, z , y masa, m , la energía cinética estará relacionada al voltaje acelerador, V , por la ecuación

$$V_z = \frac{1}{2}mv^2$$

donde v es la velocidad adquirida por el ion. A medida que los iones entran en el campo magnético H , experimentan una fuerza en dirección ortogonal al campo, experimentando como resultado una curvatura en su trayectoria. Esta fuerza aceleradora, Hev , está balanceada por la fuerza centrípeta, de manera que:

$$Hev = \frac{mv^2}{r}$$

donde r es el radio de curvatura. La eliminación del factor velocidad da lugar a la ecuación

$$m/z = H^2 r^2 / 2V$$

Por lo tanto, a un radio fijo, r , y para un ion de carga unitaria, la masa enfocada hacia S_2 y recolectada en el detector es proporcional al cuadrado del campo magnético e inversamente proporcional al voltaje acelerador. Variando uno de esos dos parámetros, los iones de diferente relación carga-masa pueden ser desviados hacia el detector, y de esta forma se explora el espectro de masas.[ref\(249\)](#)

Para la mayoría de las aplicaciones es preferible variar el campo magnético y mantener constante el voltaje acelerador. Cuando el voltaje se varía durante la corrida de un barrido de masas (con campo magnético constante), la eficiencia en la transmisión de iones de pequeña



masa es mucho mayor que aquella para los de gran masa. Esta discriminación de masa es atribuible al hecho de que un ion de masa 400 tendrá un décimo del voltaje de aceleración de un ion de masa 40. Como la región de masas mayores es la parte más importante del espectro, el barrido de voltaje se usa sólo en casos especiales cuando el barrido magnético es inadecuado.

Espectrometría de masas con analizador magnético.

Los instrumentos con analizador magnético ofrecen gran resolución y consecuentemente son más complejos y caros que los analizadores de cuadrupolo o de trampa iónica. La resolución es una consideración importante al elegir entre los sistemas. Esta se define por la siguiente ecuación:

$$\text{Resolución} = M/\Delta M$$

m es la masa del ion, y ΔM es la diferencia entre las masas M y la del ion adyacente. Los sistemas de alta resolución poseen una resolución en magnitudes de 10,000 o más. Ellos pueden separar un ion de masa 200.00 de uno de masa 200.02. Sistemas con resolución menor de 1000 se consideran de baja resolución. Un instrumento con una resolución de 800 separaría un ion de masa 800 de uno de masa 801. La mayoría de las aplicaciones clínicas, ambientales y forenses se pueden lograr con instrumentos baratos de baja resolución.

Detectores.

Casi todos los espectrómetros de masas detectan iones usando multiplicadores electrónicos. La señal del ion impactante se amplifica de la misma forma que se describió en la pág. 92 del Capítulo 4.

Computadoras.

Los espectrómetros de masas modernos usan interfaces con computadoras y otros medios que les dan capacidades de operación, y para guardar y analizar los datos.

Formación de Fragmentos Iónicos

Ionización electrónica (IE).

La *ionización electrónica* (IE, impacto electrónico) es el método más usado de ionización. Para que esta ocurra, los electrones de bombardeo deben poseer suficiente energía para extraer un electrón de la capa electrónica exterior de la molécula durante la colisión inicial. El *potencial de ionización* de una molécula es la energía necesaria para extraer dicho electrón de la capa exterior; la mayoría de los compuestos orgánicos tienen potenciales de ionización en el rango de 7 a 13 electrón volts (eV). Por lo tanto, la energía del haz electrónico ionizante tiene que superar el potencial de ionización de la molécula analizada para poder remover el electrón de su banda de valencia. Los espectrómetros de masas normalmente se han estandarizado en una energía de 70 eV para el haz electrónico ionizante. Con este valor

el haz electrónico siempre tiene suficiente energía para ionizar eficientemente las moléculas de la muestra. Además, al bombardear a 70 eV, los iones generados en las colisiones quedan con un remanente de energía que aumenta su descomposición en fragmentos menores, obteniéndose una mayor información estructural.

A medida en que las moléculas de la muestra gaseosa entran en la cámara de ionización (Fig. 8-3) son bombardeadas por el haz de electrones, originado en un filamento incandescente de tungsteno o renio. Un pequeño potencial positivo en la placa repelente, enfoca y expulsa los iones positivos a través de la ranura de salida hacia el analizador de masas. Un potencial mucho mayor está situado en una o más placas, y se usa para acelerar los iones después de pasar la ranura de salida. Se utiliza una ranura de enfoque para dirigir la trayectoria de los iones hacia el analizador de masas. En la cámara de ionización se forman también iones negativos. Estos también pueden ser analizados invirtiendo la polaridad de los potenciales en las placas repelentes y aceleradoras. Los compuestos que pueden dar fácilmente un electrón extra, como los medicamentos que contienen halógenos (o fármacos derivatizados con compuestos que tienen halógenos), aromáticos policíclicos, y fenoles sustituidos pueden generar una cantidad significativa de iones negativos, lo que permite una detección sensible por espectrometría de masas de iones negativos. Sin embargo, el espectro resultante en estos casos tiene menos fragmentos iónicos, y éstos usualmente son de masa relativamente pequeña, en consecuencia, el IE de iones negativos da menos información estructural que su contraparte positiva, y por ello la mayor parte de las aplicaciones están centradas en la espectrometría de masas de iones positivos.

Ionización química.

La *ionización química* (IQ) es otra técnica que ha hallado gran utilidad porque permite mantener control sobre el sitio y grado de la fragmentación iónica. La IQ está basada en un enfoque indirecto para obtener la formación de iones moleculares de la muestra. Se introduce un gas reactivo en la cámara de ionización antes de meter la muestra. El *gas reactivo* se ioniza por el haz electrónico a 70 eV para producir *iones gaseosos reactivos*. Cuando las moléculas de la muestra entran en la cámara, hacen impacto con estos iones gaseosos, lo que resulta en una transferencia de carga del ion gaseoso reactivo hacia la molécula de la muestra. Este “delicado” proceso de ionización produce moléculas ionizadas en la muestra que son relativamente estables y por tanto, de larga vida. La versatilidad de los sistemas IQ reside en la posibilidad de seleccionar diferentes gases reactivos para afectar la magnitud y sitio de la ionización de la muestra. Esta flexibilidad permite mantener un control sobre la complejidad del espectro resultante y por tanto, del grado de la información estructural derivada. El metano, isobutano, agua, y amoníaco son algunos de los gases reactivos más comunes en la IQ. Los fragmentos generados pueden diferir entre si dependiendo del reactivo gaseoso utilizado y de las características químicas del compuesto analizado. La elección de un gas reactivo particular influirá en el proceso de ionización. Pueden ocurrir muchos mecanismos diferentes para la transferencia de cargas, como la transferencia de protones, intercambio de cargas, o ionización negativa. Las reacciones de transferencia de protones y, en menor medida, la ionización negativa, han recibido la mayor atención y la más amplia aplicación. El gas reactivo metano ejemplifica el proceso de transferencia de protones.

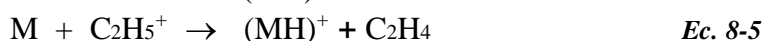
El bombardeo con electrones de alta energía crea una abundancia de iones CH_4^+ y



CH_3^+ (ecuación 8-1) los cuales rápidamente reaccionan con el gas metano en exceso para formar iones estables CH_5^+ y C_2H_5^+ . [ref\(250\)](#)



CH_5^+ y C_2H_5^+ son aductos relativamente estables y constituyen cerca del 90% de la ionización total del metano cuando las moléculas de la muestra entran a la cámara de ionización. Ellos reaccionan como ácidos de Brönsted con la mayor parte de las moléculas que entran (M), protonándolas para obtener el *ion cuasimolecular* $(\text{MH})^+$ correspondiente a su peso molecular más uno (ecuaciones 8-4 y 8-5).



De manera similar, el gas reactivo isobutano da un número predominante de iones del gas reactivo *terbutilo*, que protonan las moléculas de la muestra de la siguiente manera:



La IQ se considera como una técnica de ionización “blanda” debido a que su proceso de ionización ocurre con baja transferencia de energía comparado a la IE. En consecuencia, el ion cuasimolecular producido es relativamente estable y de larga vida en comparación con el ion molecular formado en el espectro de IE. Debido a esta estabilidad, el ion cuasimolecular no experimenta una fragmentación tan extensiva en fragmentos iónicos secundarios como los iones moleculares en el espectro de IE. Sin embargo, la IQ implica cierta transferencia de energía, ya que la reacción de transferencia de protones entre los iones del gas reactivo y la molécula de la muestra es un proceso exotérmico productor de energía. El monto de energía transferida al ion $(\text{MH})^+$ recién formado es proporcional a la reacción exotérmica y determinará la estabilidad y por tanto la supervivencia de $(\text{MH})^+$ en la cámara de ionización. A mayor exotermicidad de la reacción, más tendencia tendrá el $(\text{MH})^+$ a descomponerse.

Fragmentación de Masa

Durante la colisión, la energía se transfiere del haz de ionización a la molécula de la muestra. El residuo resultante puede disipar algo de su exceso de energía liberando su electrón de la capa exterior para dar lugar a un *ion molecular* (M^+) positivamente cargado, que corresponde al peso molecular del compuesto (Fig. 8-6). El peso molecular es uno de los componentes más importantes en el conjunto de la información obtenida de un espectro de masas. La intensidad del pico de este ion molecular es directamente proporcional a la duración de la vida del ion. Un ion molecular estable durará más y por tanto producirá un pico intenso, en tanto que un ion de corta vida producirá un pico pequeño. La mayoría de los iones moleculares son de corta vida porque tienen un alto nivel de energía. Frecuentemente son tan



inestables y de vida tan corta que no persisten el tiempo necesario para ser detectados. En casos así el espectro de masas no mostrará en absoluto el pico correspondiente al ion molecular. En general, los iones que puedan disipar internamente su exceso de energía con facilidad, como los fragmentos extensamente conjugados, son más estables y por consiguiente de más larga vida.

La ionización IE puede alcanzarse sólo cuando las moléculas de la muestra existen en estado gaseoso. Están disponibles varios medios apropiados para vaporizar y dispensar las moléculas gaseosas a la cámara de ionización, como se discutirá posteriormente en este capítulo.

En general, los iones moleculares presentan un exceso de energía y por tanto son inherentemente inestables. Ellos disipan su energía excedente rompiendo los enlaces internos y experimentando descomposiciones unimoleculares, que resultan en fragmentos iónicos secundarios (F^+). Simultáneamente, se forman también fragmentos por colisiones ion-molécula e ion-ion, que ocurren aleatoriamente en la cámara de ionización. Los fragmentos secundarios son de masa pequeña; esos fragmentos continúan el proceso de disipación de energía por subsecuentes descomposiciones así como por colisiones aleatorias con otras moléculas e iones. El efecto resultante es la formación de un gran número de fragmentos iónicos con valores de m/z que van desde el peso molecular del compuesto en lo más alto del espectro, hasta los más bajos valores explorados de m/z . Esos fragmentos son detectados y graficados de acuerdo a sus relaciones m/z contra la intensidad para generar el espectro de masas del compuesto. Los patrones de fragmentación dan un conjunto de información estructural acerca de la molécula de interés. Ellos proporcionan la “huella digital” que permite a los espectrometristas de masas verificar la identificación de los compuestos.

Cuando se está llevando a cabo la elucidación de una estructura molecular que no puede ser identificada al confrontar la información con una biblioteca espectral, hay que examinar el espectro de masas que muestra los patrones de fragmentación, ya que eso puede dar una extensa información estructural. El enfoque inicial se centra en la identificación del ion molecular que aparece con la pérdida del primer electrón y corresponde al peso molecular del compuesto de interés. El conocimiento del peso molecular del compuesto es extremadamente útil para identificar la incógnita. La fragmentación subsecuente atribuible a la descomposición unimolecular y a reacciones ion-molécula dan otros fragmentos característicos que pueden ayudar a identificar los restos químicos presentes en el compuesto. En general, los fragmentos de mayor m/z son más útiles en la identificación de compuestos que los de menor m/z . La razón es que los fragmentos de mayor m/z representan la fragmentación de la molécula de interés en las primeras etapas de su ruptura en la cámara de ionización. Por tanto, esos fragmentos están más próximos a la estructura original de la molécula y son entonces más “peculiares” que los de menor m/z . Los fragmentos de menor m/z son partes menores de la molécula, y aunque ellos pueden dar información estructural, esta información es menos específica. Los iones más abundantes en el espectro de masas por IE desafortunadamente son casi siempre los de menor masa y no son necesariamente exclusivos del compuesto de interés. La información de los iones de menor m/z es aún útil, en el caso que el compuesto que se está analizando sea puro. Con CG/EM o CL/EM esto requiere de una buena separación cromatográfica y evitar la interferencia de compuestos co-eluyentes. La Fig. 8-7 muestra la descomposición postulada por IE para la cocaína.^{ref(251)} El ion molecular tiene una m/z de 303 y, aunque es débil, se puede ver fácilmente en el espectro de masas (ver Fig. 8-1). La carga del



ion molecular se localiza en el átomo de nitrógeno y en menor extensión en los dos átomos de oxígeno carbonílicos. La descomposición del ion molecular ocurre por diferentes vías. La ruptura del anillo de seis miembros del ion molecular con la pérdida de ácido benzoico genera un ion carbonio relativamente estable de m/z igual a 182, que se ve como un fragmento intenso. La pérdida del metoxilo del ion molecular genera el fragmento menor de m/z igual a 272, y el fragmento del carbonilo aromático de m/z igual a 105 también se forma por desprendimiento del ion molecular. El pico base tiene un valor de m/z igual a 82 y representa la formación de un anillo pirrólico sustituido, que es muy estable por su estructura anular altamente resonante.

Ciertos elementos que se presentan frecuentemente en una amplia variedad de moléculas, incluyendo drogas y sus metabolitos, tienen un comportamiento espectrométrico típico que suministra información adicional. El nitrógeno, por ejemplo, es el único elemento comúnmente hallado que tiene una masa atómica par y una valencia impar. Entonces, si el ion molecular tiene masa par, se puede deducir que el compuesto de interés o no tiene átomos de nitrógeno o bien tiene un número par de átomos de este elemento. Se puede obtener información adicional del espectro de masas cuando el compuesto de interés tiene dos o más isótopos naturales en abundancia. Los fragmentos iónicos que contienen átomos de halógenos tienen agrupaciones isotópicas características que se originan a partir de los dos isótopos presentes. Por ejemplo, los isótopos naturales del cloro son ^{35}Cl y ^{37}Cl con abundancia relativa de 75.8% y 24.2% respectivamente. Por tanto, cualquier fragmento conteniendo átomos de cloro siempre generará un patrón característico, consistente en un doble pico a una distancia de dos unidades atómicas con una relación de 3:1. El cloro, el bromo y en menor grado, el silicio y el azufre son los únicos elementos con suficiente abundancia de isótopos naturales para generar información útil con espectrómetros de masas de baja resolución. Otro hecho útil a recordar es que la relación de abundancia entre carbono-13 a carbono-14 es aproximadamente 1.1%. Al incrementar el número de átomos de carbono en un ion, disminuye la probabilidad de que uno de esos átomos sea un isótopo de ^{13}C . La relación de $(M+1)/M$ para un ion de carbono-10 exhibirá entonces 10 veces la probabilidad del ^{13}C , o $10 \times 1.1\% = 11\%$. Aunque de manera aproximada, esto permite determinar el número de átomos de carbono, lo que es de cardinal importancia en la interpretación de las líneas espectrales de compuestos orgánicos desconocidos. Para obtener una composición elemental más precisa es necesario un espectrómetro de masas de alta resolución.

La estructura básica molecular y las cadenas colaterales de los compuestos orgánicos se pueden correlacionar a menudo con fragmentos iónicos específicos en el espectro de masas. Los metabolitos frecuentemente tienen estructuras similares y las mismas cadenas moleculares que los compuestos originales. Consecuentemente, sus espectros de masas a menudo contienen fragmentos iónicos similares o idénticos. Cambiando químicamente los compuestos originarios, ya sea por metabolismo o por formación de derivados, conduce a la anticipación de fragmentos iónicos en el espectro, haciendo más simple la identificación. Tales observaciones empíricas son útiles en el proceso de identificación. Este reconocimiento de patrones es especialmente útil en la identificación de metabolitos de drogas y agentes tóxicos conocidos. Hay numerosos patrones de descomposición de varios residuos químicos que se han aplicado sistemáticamente a la interpretación de patrones de fragmentación. Una discusión de tales interpretaciones está fuera del alcance de este capítulo, y les referimos a otras



publicaciones en esta materia. [refs\(252\)](#)

Una ventaja primordial del espectro de IQ es su simplicidad relativa en comparación con el espectro correspondiente por IE. Una comparación del espectro por IQ en el isobutano de la cocaína (Fig. 8-8) con el obtenido por IE (ver Fig. 8-1) demuestra esto. Comparado con el complejo patrón de fragmentaciones de IE, el espectro de masas de IQ es más simple y contiene sólo unos pocos iones. El espectro de IQ en el isobutano de la cocaína está dominado por un ion cuasimolecular que revela fácilmente el peso molecular de la muestra. Como se discutió previamente, el peso molecular es una de las partes más importantes de la información que puede ser obtenida del espectro de masas. De ahí que la IQ sea útil en la obtención de información sobre el peso molecular que puede no ser siempre fácilmente asequible por técnicas de IE. Otra gran parte de la fragmentación en el caso de IQ aparece por la pérdida de grupos ácidos del ion cuasimolecular. Por ejemplo, los benzoésteres (como la cocaína) pueden mostrar la pérdida de ácido benzoico, los acetoésteres, la pérdida de ácido acético, y los alcoholes alifáticos, la pérdida de agua.

Comparación Entre Ionización Electrónica y Química

La sensibilidad es otro factor importante que es afectado por el proceso de ionización. Característicamente, la sensibilidad de la IQ puede exceder la sensibilidad de la IE en varios órdenes de magnitud. Esto se puede atribuir a la facultad de la IQ de concentrar la corriente iónica total en un pequeño número de iones (debido a la fragmentación mínima). Compare el patrón de fragmentación en IQ de la cocaína con el obtenido con IE. El espectro de IQ (Fig. 8-8) demuestra que la mayoría de los fragmentos generados son de m/z 304 y 182. Esto contrasta completamente con la fragmentación en la IE (Fig. 8-1) donde las m/z de 182 y 303 constituyen sólo una pequeña porción del número total de fragmentos generados. Como se puede ver fácilmente, en la IQ los iones principales tendrán una respuesta típicamente mayor por unidad de peso de la muestra y por tanto mayor sensibilidad (comparado con los iones abundantes de IE). Adicionalmente, tales iones obtenidos por IQ tienden a tener mayores valores de m/z y por tanto son más inusuales que los iones abundantes en IE, los cuales tienden a presentar un bajo valor de m/z . Note que en el caso de la cocaína el pico base por IE está en los valores bajos de masa (m/z de 82), mientras que en IQ está en los valores altos (m/z de 182 con IQ de metano y m/z de 304 con IQ del isobutano). Este ejemplo también sirve para demostrar que la selección del gas reactivo tendrá una influencia pronunciada en la magnitud de la fragmentación y en la sensibilidad del análisis. Los compuestos que tienen diferente peso molecular generalmente dan espectros de IQ con traslape mínimo, permitiendo la identificación segura de los compuestos objeto de estudio, incluso cuando la CLG falla en separar adecuadamente los componentes de interés. [ref\(253\)](#)

Los datos de ionización química pueden dar una significativa información espectral que se puede usar por si misma, o para completar los datos de IE. Los datos adicionales de IQ pueden dar mayor especificidad; esto es valioso para aumentar la exactitud de los resultados. Una situación así se demuestra en la Fig. 8-9, que ilustra el espectro de masas de la metanfetamina y la fentermina en las modalidades de IE e IQ, respectivamente. Aunque los dos compuestos son isómeros estructurales, la metanfetamina es una droga ilícita, mientras que la fentermina no lo es. Como se puede ver en la Fig. 8-9, A, el espectro de masas por IE

392

de esos dos compuestos es virtualmente idéntico, y la identificación basada en los datos del barrido total con IE o en el monitoreo de ion seleccionado (MIS) es incapaz de distinguir los dos compuestos. Aún más, los tiempos de retención en cromatografía de gases (CG) pueden ser similares en muchos de los protocolos de CG/EM usados rutinariamente en los laboratorios de ensayo de drogas de abuso.[ref\(254\)](#) Es muy posible que un ensayo lleve a un resultado falso positivo de metanfetamina cuando las anfetaminas no derivadas se analizan por la popular técnica de ionización MIS (ver pág. 178). De hecho, algunos laboratorios certificados por el Instituto Nacional de Drogas de Abuso (“National Institute of Drug Abuse” o “NIDA”. En inglés) perdieron su certificación debido a resultados falsos positivos de anfetaminas. Todos esos laboratorios estaban utilizando IE y se apoyaban en tres técnicas de MIS.

En contraste con el espectro de IE, la metanfetamina y la fentermina son fácilmente diferenciables en la IQ por la presencia de un ion significativo de relación m/z igual a 133 en la fentermina que no existe en el espectro de la metanfetamina (Fig. 8-9, B). En este caso, la ionización química elimina todas las ambigüedades y elimina totalmente la posibilidad de falsos resultados positivos. Las técnicas de IQ deben ser vistas como complementarias a las de IE porque ayudan a aminorar las brechas que pueden encontrarse en las especificidades de la IE. Debido a esas características complementarias con la IE, se ha recomendado que el Comité Olímpico Internacional realice análisis por ionización química para cada muestra positiva.[ref\(255\)](#) Los avances instrumentales de estos últimos años han hecho de la IQ una técnica práctica y fácil de usar. La incorporación del análisis de IQ en los laboratorios de ensayo de drogas de abuso también puede ser costeable ya que esta puede acelerar el tiempo de análisis al dar mayor certidumbre en la identificación.

Los iones negativos formados bajo condiciones de IQ son mucho más útiles que los producidos con IE; existen importantes aplicaciones para la ionización química de ion negativo (IQIN). Mientras que los iones negativos en la IE tienden a tener fragmentos de masa pequeña que imparten poca información estructural, los iones negativos en IQ tienden a tener más fragmentos útiles de gran masa. La información de la IQIN puede servir también para complementar la información obtenida de los espectros de masas del ion positivo generado en condiciones de IQ e IE. La formación de iones negativos de la muestra en condiciones de IQ sucede a través de tres vías primarias: captura de electrones, pérdida de protones, y asociación. De las tres vías primarias, el proceso de captura de electrones (CE) ofrece el enfoque más viable para el examen de drogas y muestras clínicas. El proceso de ionización de CE tiene lugar cuando la molécula de la muestra captura un electrón térmico o de baja energía en el plasma del gas reactivo. Para que este sea el proceso predominante, el gas reactivo tiene que ser el que genere electrones de baja energía durante el bombardeo electrónico.

Además, el gas mismo no puede formar iones negativos capaces de reaccionar con la molécula de la muestra. El metano cumple con estos requerimientos. Al ionizarse, el metano forma CH_4^+ y CH_3^+ (ecuación 8-1), así como electrones de baja energía. La captura de esos electrones por las moléculas de la muestra y la subsiguiente descomposición de los iones negativos resultantes, producen el patrón de fragmentación de la IQIN. Frecuentemente se genera un fragmento iónico intenso ($M-1$). La IQIN se caracteriza por una sensibilidad muy alta. En muchos casos la intensidad del ion base negativo obtenido por IQ es 30 a 100 veces más grande que la del de ion base positivo.[ref\(256\)](#) Esto puede llevar eficazmente los niveles de detección de rutina a los femtogramos.



Uso del Espectrómetro de Masas

Análisis de barrido total.

El análisis espectrométrico de barrido total en el modo de ionización electrónica es probablemente la mejor técnica espectrométrica para la identificación inequívoca de una droga o su metabolito o metabolitos. En el modo de barrido total, se barre repetidamente todo el rango de masas de interés. El barrido se programa para comenzar en los valores de alta m/z y terminar en los de baja m/z del rango de interés. En cada barrido todos los fragmentos iónicos generados son monitoreados y visualizados. La velocidad de barrido tiene que ser suficientemente baja para que el detector pueda registrar un fragmento dado, pero con la suficiente rapidez para que puedan hacerse múltiples barridos durante un análisis dado. Son necesarios múltiples barridos para que los cálculos estadísticos referentes a los iones sean significativos. El espectro de masas resultante, conteniendo todos los fragmentos iónicos generados, ofrece un alto grado de especificidad. En combinación con la alta sensibilidad de la espectrometría de masas, esta “huella digital” de barrido total es extremadamente efectiva para proveer una identificación efectiva de compuestos orgánicos como drogas y sus metabolitos.^{ref(257)} Los sistemas modernos a menudo descansan en programas de confrontación computarizados para identificar compuestos desconocidos. Esto se hace comparando el espectro de masas obtenido con un espectro de referencia previamente almacenado. Existe una variedad de bibliotecas de espectros disponibles comercialmente. Hay también muchos algoritmos de búsqueda para comparar el espectro desconocido con el espectro de referencia almacenado en las bibliotecas. Entonces la búsqueda de picos, la confrontación basada en el cálculo probabilístico, la búsqueda directa o inversa, la búsqueda de pureza, y el algoritmo de búsqueda por ajuste y ajuste inverso son de empleo común. Aunque una descripción detallada de los algoritmos y bibliotecas de búsqueda está fuera del enfoque de este capítulo, la referencia 11 ofrece una buena discusión de este tópico.

Las técnicas de barrido total son más exigentes en términos de limpieza de la muestra. Deben evitarse compuestos interferentes o coeluyentes. La presencia de compuestos interferentes genera iones extraños y complica el espectro resultante. Esto puede hacer la identificación difícil o imposible. En consecuencia, la mayoría de las muestras son purificadas antes del análisis. Las muestras son purificadas recrystalizando los sólidos, realizando limpieza orgánica por extracción de las muestras que tienen fluidos biológicos o material particulado (como sustancias orgánicas en suelos), y separación cromatográfica por cromatografía de gases o de líquidos antes del análisis espectrométrico de masas.

Un cromatograma de corriente iónica total (CIT) se genera comúnmente cuando se utiliza la separación cromatográfica. La corriente iónica total se integra, y la salida cromatográfica resultante asemeja un cromatograma CGL convencional. El espectro de masas de barrido total se genera típicamente en el máximo del pico cromatográfico para aumentar la sensibilidad. Sin embargo, se pueden generar múltiples líneas espectrales de cualquier parte del pico, lo que es útil para asegurar la pureza y la resolución cromatográfica. Los componentes coeluyentes se pueden detectar fácilmente incluso en situaciones en que la forma del pico de CIT es completamente simétrica. A pesar de que el análisis de barrido total ofrece la más alta especificidad, su sensibilidad es limitada. Barrer cada fragmento en el espectro significa que el

detector invierte un tiempo significativo en regiones donde los fragmentos dan aductos de baja intensidad. Consecuentemente las mismas características que hacen las técnicas de barrido total altamente específicas son responsables de la limitación de su sensibilidad. Los aspectos que influyen grandemente en la sensibilidad se discutirán posteriormente con más detalle en este capítulo.

Monitoreo de ion seleccionado.

Se puede obtener una mayor sensibilidad en la IE cuando se opera el espectrómetro de masas en el modo de *monitoreo de ion seleccionado*, con el que se monitorean las corrientes iónicas en sólo unas cuantas señales de masas preseleccionadas intensas del compuesto de interés. El uso de pocos fragmentos iónicos para la identificación de compuestos es menos específico que el uso de un barrido total, ya que se descarta el resto de los fragmentos iónicos. Esta técnica se dirige frecuentemente a aplicaciones de identificación de compuestos como el análisis clínico o forense de drogas de abuso y es conocida con varios nombres (MIS, monitoreo seleccionado, selectivo, o simultáneo de iones; DIM, detección de ion múltiple; y ASM, almacenamiento selectivo de masas). Históricamente, el uso de técnicas MIS surge de las limitaciones en sensibilidad de las técnicas de barrido total en sistemas de sector magnético y cuadrupolo. En el modo de barrido total los espectrómetros de masas no siempre tienen suficiente sensibilidad para detectar bajos niveles de drogas en matrices complejas como fluidos biológicos. Enfocándose en sólo unos cuantos fragmentos iónicos intensos preseleccionados, el detector se puede dedicar completamente a esos pocos iones antes que dividir el tiempo en los varios centenares explorados en el modo típico de barrido total. Consecuentemente, las técnicas de MIS tienden a mejorar la sensibilidad en alrededor de 10 a 100 veces. Esta sensibilidad mejorada, sin embargo, se obtiene a expensas de la especificidad, ya que el vasto monto de datos del espectro de masas se hace inalcanzable y se pierde. En resumen, la MIS posee una mayor sensibilidad pero da identificación menos específica.

La mayoría de las aplicaciones de la MIS utilizan sólo unos pocos iones (generalmente tres iones intensos) del espectro de masas para identificar el compuesto. Por ejemplo, el análisis por MIS de la cocaína puede utilizar los fragmentos iónicos de m/z de 303, 182, y 82 (Fig. 8-1). La selección de esos tres iones se prefiere por su intensidad relativamente alta o por su peculiaridad. El ion molecular de m/z de 303 tiene un alto valor de m/z y se considera característico de este compuesto, lo que ayuda a incrementar la especificidad analítica. El anillo pirrólico con m/z de 82 es una selección de igual índole por su alta intensidad (pico base). Aunque su valor relativamente bajo de m/z le hace ser menos específico, su intensidad ayuda al análisis por MIS a alcanzar sensibilidad en los niveles más bajos. Se debe recalcar que en el modo MIS, todos los demás fragmentos iónicos del espectro se pierden, reduciendo la especificidad total del análisis. Consecuentemente, otros compuestos pueden interferir si generan iones con los mismos valores de m/z .

A menudo los métodos de MIS tratan de aminorar las deficiencias de especificidad comparando entre si las intensidades iónicas relativas de los iones monitoreados más importantes. Esta práctica se ha usado extensamente en los laboratorios de ensayo de drogas de abuso y requiere que las relaciones de intensidades iónicas en el espectro desconocido coincidan, dentro de un 20% con las relaciones correspondientes en un estándar conocido. Una limitación en este enfoque es que las intensidades iónicas y por lo tanto las relaciones, pueden variar dependiendo de la cantidad de droga o metabolito presentes en la cámara de



ionización. Consecuentemente las relaciones iónicas de una muestra desconocida pueden no ser compatibles con las del estándar conocido, especialmente cuando las concentraciones de droga o metabolitos son mucho mayores o menores que las del estándar.[ref\(258\)](#)

Aunque la identificación en las técnicas MIS es menos específica que en el modo de barrido total, es adecuada para muchas aplicaciones. No obstante, hay que ser cuidadoso porque es posible identificar incorrectamente compuestos cuando las condiciones de medición no se han optimizado. Por ejemplo, algunos laboratorios de ensayo de drogas de abuso analizan anfetaminas por medio de CG/EM usando el ion con m/z de 44 como ion de cuantificación y el de m/z igual a 58 como ion calificativo, siguiendo un protocolo publicado por Hewlett-Packard.⁸ Un problema con este método es la elección de los iones. Esos iones tienen bajos valores de m/z y están sujetos a la interferencia potencial de varios compuestos y corrientes iónicas de fondo que pueden estar presentes en la muestra. Por ejemplo, además de la anfetamina, muchos otros compuestos derivados de aminas con acción simpático miméticas exhiben un gran pico con m/z de 58, y el dióxido de carbono (un componente común en el fondo) exhibe un pico de m/z igual a 44. Consecuentemente, pueden aparecer problemas significativos porque las drogas legales comúnmente halladas (como efedrina, fentermina, fenilpropanolamina, y otros medicamentos comunes que se toman sin prescripción médica) tienen los mismos fragmentos iónicos que se seleccionaron para caracterizar la anfetamina ilícita. Tales medicamentos legales y compuestos que no requieren prescripción, son generalmente extraídos juntos en el proceso de preparación de la muestra y sus tiempos de retención cromatográficos pueden ser cercanos a los de las drogas ilícitas.

Bajo condiciones subóptimas, los métodos de MIS tales como el procedimiento descrito para la anfetamina pueden esencialmente conducir a una identificación basada en las diferencias de los incrementos de los tiempos de retención cromatográficos. Como los tiempos de retención cromatográficos cambian frecuentemente, existe la posibilidad de un resultado falso positivo o negativo. La probabilidad de confirmaciones dudosas de drogas puede aumentar en laboratorios donde los operadores de CG/EM, que a veces tienen poco conocimiento de los principios de la espectrometría de masas, se vean presionados bajo excesivas cargas de trabajos con tiempos de retorno estrictos. Algunos laboratorios de ensayo de drogas de abuso forenses certificados por la NIDA han perdido su acreditación de pruebas por resultados falsos positivos de anfetaminas o metanfetaminas generados por tales análisis de MIS. En conclusión, se puede inferir que las técnicas de MIS tienen fallas en la especificidad y que estas fallas pueden potencialmente conducir a serios errores insospechados.

Emplear técnicas de espectrometría de masas que ofrezcan mayor especificidad, como la IE o IQ con barrido total o ambas a la vez, puede ayudar a minimizar los errores analíticos o de interpretación. Es posible también incrementar tanto la sensibilidad como la especificidad del espectro de masas por técnicas no instrumentales. Sin embargo, ese análisis está fuera del enfoque de este capítulo, y esta discusión se orienta primariamente a los métodos instrumentales EM para aumentar la sensibilidad y la especificidad.

Cuantificación.

Las técnicas de MIS son muy apropiadas para el análisis cuantitativo porque se pueden monitorear simultáneamente varios fragmentos iónicos diferentes. Esta salida de masas espectral es llamada frecuentemente como *perfil de ion seleccionado*, o *cromatograma de ion*

seleccionado. En espectrometría de masas la exactitud cuantitativa se logra mejor incorporando un estándar interno, que se añade al inicio del proceso analítico. La adición de una cantidad conocida de estándar interno permite calcular la pérdida de material en cualquier etapa analítica incluyendo los pasos de extracción, formación de derivados, y análisis. Consecuentemente, los estándares internos seleccionados, deben asemejarse químicamente tan estrechamente como sea posible a los compuestos de interés, de manera que sus comportamientos químicos y físicos correspondan con los del compuesto desconocido. Es por esta razón que se usan ampliamente compuestos deuterados como estándares internos. La técnica de cuantificación usando compuestos que se diferencian sólo por su composición isotópica se denomina *dilución isotópica*. En el caso de análisis de drogas se usa un estándar interno deuterado idéntico a la droga bajo análisis, excepto en que se han sustituido uno o más átomos de hidrógeno por deuterio. El número y posición de los átomos deuterados se elige según la facilidad de síntesis y posición en el patrón de fragmentación iónico. Como resultado se obtiene un estándar interno con características muy similares en términos de polaridad, coeficiente de partición, obtención de derivados, y cromatografía comparadas con las de la droga. De hecho, el estándar interno tendrá un tiempo de retención cromatográfico casi idéntico al de la droga debido a su semejanza estructural (Fig. 8-10). En la CLG convencional, no se puede usar un estándar interno deuterado porque el compuesto tiene que ser resuelto cromatográficamente a partir del compuesto de interés. En espectrometría de masas esto no es un problema porque la masa atómica del átomo de deuterio es 1 UMA (unidad de masa atómica) más que la del hidrógeno. El estándar interno deuterado tiene un peso molecular diferente y por tanto se diferencia de la droga más por la masa que por el tiempo de retención cromatográfico. Su patrón de fragmentación imitará el de la droga, pero el valor de m/z correspondiente a los fragmentos portadores de átomos de deuterio será más alto.

La salida del espectro de masas por MIS muestra sólo los iones con fragmentos de la m/z que se monitorean. La cuantificación en la MIS monitorea simultáneamente los fragmentos iónicos del compuesto y los del estándar interno. La Fig. 8-10 muestra los perfiles de iones seleccionados para dos isótopos de Δ^9 - tetrahydrocannabinol sililado analizado por CG/EM. El estándar interno contiene el isótopo deuterado (d_3), que es monitoreado a una m/z de 390. El perfil iónico del compuesto de interés es el que se halla sin marcas, el cual se monitorea a m/z de 387.

Los tiempos de retención cromatográficos de los dos isótopos son esencialmente los mismos, y su detección se hace aprovechando la diferencia en los pesos moleculares de los fragmentos iónicos. Se obtiene un valor cuantitativo comparando el área del pico o la intensidad del compuesto de interés con el del estándar interno. Esta relación se usa entonces para generar un valor cuantitativo en una curva de calibración previamente establecida.

Técnicas de Separación

El espectrómetro de masas ioniza y separa todos los compuestos que entran en la cámara de ionización. Si hay más de un compuesto presente, se obtiene un patrón de fragmentación de masa que abarca todos los componentes. Por esta razón, los patrones de fragmentación más claros son aquellos en que se analiza un sólo compuesto. Por eso el



espectrómetro de masas usualmente está acoplado a un procedimiento de separación como cromatografía de líquidos o gases.

Cromatografía de gases / espectrometría de masas.

La cromatografía gas-líquido es una de las técnicas instrumentales más versátiles para la separación de mezclas complejas debido a su sensibilidad y rapidez de análisis. Las columnas de separación cromatográficas permiten virtualmente a los especialistas en cromatografía disponer de procedimientos de separación para cada compuesto de interés en la química clínica. La combinación de la versatilidad de separación de la CLG con la especificidad y sensibilidad de la espectrometría de masas hace de la CG/EM una de las más poderosas técnicas disponibles para la identificación de compuestos orgánicos. Los mismos métodos que se describieron en el Capítulo 7 se usan para preparar los compuestos para su análisis por CG/EM.

El principal problema al acoplar estas técnicas surge de la incompatibilidad en los requerimientos de presión entre ambas. La CLG requiere un gas portador fluyendo a una presión próxima a la atmosférica para mover la muestra a través de la columna. Por su parte, los espectrómetros de masas requieren de alto vacío (10^{-5} a 10^{-7} torr) para operar efectivamente. Se han usado separadores de chorro molecular combinados con bombas de vacío diferenciales, para evacuar selectivamente el gas portador justamente antes de la entrada del efluente de la CLG en la cámara de ionización del espectrómetro de masas.^{ref(259)} Los más recientes avances en columnas capilares han simplificado los requerimientos de la interfase ya que estas columnas funcionan eficazmente a velocidades de flujo mucho menores del gas portador, las cuales se encuentran dentro de las capacidades de bombeo del espectrómetro de masas. En consecuencia, los efluentes de las columnas cromatográficas pueden fluir directamente a la cámara de ionización.

Se obtienen comúnmente dos salidas de datos en la CG/EM. La primera, el cromatograma de CIT, representa la integración de la corriente iónica total contra el tiempo de elución de la columna de CLG. Es decir, todos los iones detectados se suman, y se registra la corriente total. Su patrón recuerda el de un cromatograma convencional de CLG de respuesta del detector contra el tiempo. La segunda salida es la del espectro de masas de barrido total. Este análisis descompone los iones detectados en CIT dando su patrón de fragmentos de masa. Las líneas del espectro de masas generado en las distintas partes del pico de la CIT pueden revelar fácilmente si el pico es puro o si su composición es múltiple. Adicionalmente, el espectro de masas de un hombro o pico menor puede revelar con frecuencia la identidad del componente que generó esa corriente iónica. El espectro de masas generado puede ser de barrido total o un MIS. En cualquier caso, la sensibilidad se amplifica cuando el espectro de masas se genera en el ápice del pico de CIT. La CIT puede ser también monitoreada exclusivamente en la modalidad MIS, lo que genera un cromatograma de ion seleccionado. Esta es una práctica común en aplicaciones dirigidas a la identificación de un compuesto. La salida entonces se compone sólo de los iones con el valor de m/z que se monitorea. Las cuantificaciones por MIS en esta técnica consisten en el monitoreo simultáneo de los fragmentos iónicos del compuesto de interés y los del estándar interno.



Cromatografía de líquidos / espectrometría de masas.

Otra combinación potencialmente útil es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y la espectrometría de masas. Las barreras en la interfase con la CL son incluso mayores que en el caso de la CG a causa de que la fase móvil usada para impulsar los componentes a través de la columna de HPLC es menos volátil y por tanto más difícil de eliminar selectivamente (antes del análisis de espectrometría de masas) que la fase móvil gaseosa usada en CLG. Aún más, la CL se usa a menudo para separar componentes que no son particularmente volátiles o termolábiles. Esto causa la incompatibilidad, puesto que las muestras deben ser primero volatilizadas al estado gaseoso antes de que puedan ser analizadas por espectrometría de masas. La dificultad en convertir moléculas no volátiles solvatadas en un líquido a la forma gaseosa sin inducir una descomposición excesiva ha sido siempre la base de la incompatibilidad; por esto la evolución de la CL/EM ha sido más lenta que la de la CG/EM.

El termospray es una aproximación al análisis por CL, este proceso crea gotas cargadas. La punta del capilar a través de la cual emerge el eluado del HPLC se calienta por la aplicación de un alto voltaje. Optimizando la temperatura, se provoca la proyección de pequeñas gotas (nebulizador) del tubo hacia la cámara de ionización.

El termospray se basa en un proceso de “evaporación-ionización” en que los iones son emitidos desde la fase líquida hacia la gaseosa.[ref\(260\)](#) En teoría, una gota cargada contiene el solvente e iones positivos y negativos, predominando los iones de una de las polaridades. La diferencia es la carga neta; se asume que la carga excedente se halla en la superficie de la gota. A medida que el solvente se evapora, el campo eléctrico en la superficie aumenta porque el radio de ésta decrece. Si la gota se evapora lo suficiente, se alcanza un campo crítico en que se emiten iones desde la superficie. La Fig. 8-11 ilustra el proceso de evaporación-ionización. El *nebulizador iónico*¹⁴ es una técnica más nueva pero relacionada con la anterior y es apropiada para la introducción de compuestos termolábiles en el espectrómetro de masas. Difiere del termospray en que no utiliza calor para producir la nebulización y puede hacerse con facilidad a presión atmosférica. El termospray es generalmente operado a alto vacío, aunque puede usarse aún a presión atmosférica. Se requieren altas temperaturas para efectuarlo. El nebulizador iónico permite la introducción de compuestos complejos y polares en el espectrómetro de masas. Aquel genera también un ion cuasimolecular y es especialmente apropiado para compuestos polares y termolábiles. Junto con el HPLC, el nebulizador iónico se puede acoplar a cualquier otra técnica de separación como la electroforesis capilar por zonas para permitir el análisis de muestras biológicas complejas.[ref\(261\)](#)

Sonda de sólidos.

La espectrometría de masas directa que usa la introducción de sólidos por una sonda se ha usado durante muchos años para la identificación rápida de compuestos específicos por los toxicólogos.[refs\(262\)](#) Esta técnica es conveniente para compuestos de baja volatilidad que pueden introducirse directamente en la cámara de ionización. Otra ventaja de la espectrometría de masas con sonda de sólidos es que elimina el paso de separación cromatográfica; consecuentemente, el análisis se puede realizar muy rápidamente. El análisis de EM con sonda de sólidos se ha usado extensamente en los modos de IE e IQ con compuestos puros. Para especímenes biológicos la IQ es especialmente práctica, ya que se puede hacer la identificación



de compuestos sobre la base de su peso molecular.

Otros Espectrómetros de Masas

El detector de trampa de iones (DTI).

Los espectrómetros de masas basados en la tecnología de la trampa de iones son diferentes por su diseño del resto de los sistemas de EM. Todos los instrumentos comerciales actuales de este tipo son instrumentos de mesa relativamente baratos. Los espectrómetros de trampa de iones combinan las funciones de una cámara de ionización y un analizador de masas. Esto se logra con una simple combinación en un electrodo triple, consistente en un anillo con dos tapas en los extremos (Fig. 8-12). Esta simplicidad tiene un marcado contraste con los complejos ensamblajes mecánicos que se hallan comúnmente en los espectrómetros de cuadrupolo y sector magnético. Los electrones que salen de un filamento calentado son impulsados por un electrodo de control hacia la cavidad central donde ionizan las moléculas de la muestra, resultando el patrón de fragmentación característico por IE del compuesto. La característica que distingue a los espectrómetros de masas de trampa de iones es que “atrapan” y “acumulan” en la cavidad de la cámara de ionización los iones generados. Esto se logra aplicando un voltaje de radio frecuencia al electrodo anular central, que provoca el atrapamiento y acumulación temporal de los iones de interés en la cámara de ionización. Los iones atrapados son expelidos selectivamente de la cavidad según sus masas, de acuerdo a su relación m/z , hacia el multiplicador electrónico donde son detectados. El atrapamiento y la acumulación efectivas de iones dan como resultado la concentración de los iones de interés; consecuentemente se obtienen sensibilidades muy altas con el DTI. La sensibilidad superior de la trampa de iones permite al usuario obtener espectros de masas de barrido total con límites de detección comparables a los del análisis por MIS en detectores de cuadrupolo convencionales.

Espectrometría de tiempo de vuelo.

El espectrómetro con analizador de tiempo de vuelo requiere que los iones generados en la cámara de ionización viajen a través de una distancia fija para alcanzar el detector. El voltaje acelerador impulsa los iones hacia un “tubo de arrastre” que tiene típicamente un metro de longitud. Las velocidades de los iones son proporcionales a sus masas. Por consiguiente los iones de masa diferentes viajan a distinta velocidad, alcanzando el detector en momentos distintos. El valor de m/z de cualquier ion dado se puede determinar matemáticamente haciendo una medición precisa del tiempo que le toma atravesar la distancia hasta el detector. Actualmente este tipo de analizador se usa en la investigación para el análisis de los biopolímeros complejos en el rango de picomoles. Este tipo de instrumento que usa ionización por remoción con láser es apropiado para la medición de moléculas de gran masa y puede determinar el peso molecular de péptidos, proteínas intactas y glicoproteínas de dimensiones de hasta 300,000 daltones.

Espectrometría de masas en tándem (EM/EM)

En general, se puede lograr mejorar la selectividad y los límites de detección de las técnicas instrumentales con un pretratamiento extensivo de las muestras (extracción, obtención de derivados, separación cromatográfica y otros) antes de realizar la espectrometría de masas. Un enfoque alternativo al mejoramiento de los límites de detección y la sensibilidad, es acoplar dos o más técnicas analíticas en tándem. [ref\(263\)](#) Por ejemplo CG/EM, CG/EM/IR, EM/EM, y CG/EM/EM.

La aceptación que han tenido las aplicaciones de espectrometría de masas en tándem (EM/EM) se puede atribuir a la facultad de esta técnica de proveer:

- 1- Incremento en la velocidad de análisis.
- 2- Disminución del costo por muestra.
- 3- Límites de detección mejorados en mezclas complejas.
- 4- Análisis rápido, sensible, y selectivo de mezclas complejas, frecuentemente con poca o ninguna limpieza de la muestra. [refs\(264\)](#)

Se puede hacer EM/EM con sonda de sólidos en el caso de drogas a las que es difícil de realizar el cromatograma y por tanto no se puede correr en la CG/EM convencional. En la EM/EM se introduce una muestra en la cámara de ionización del primer espectrómetro de masas donde la ionización de la mezcla produce iones característicos de los componentes individuales de la droga, llamados *iones madres*. Un ion madre característico del compuesto de interés es seleccionado e identificado. Esto “separa” el compuesto de interés de los otros componentes de la mezcla, pudiéndose concebir esto como un análogo del paso de separación cromatográfica en la CG/EM. El ion madre objeto de estudio se somete entonces a un segundo análisis de EM, donde se fragmenta otra vez en partículas iónicas secundarios llamadas *iones hijas*. Esta etapa es análoga a la ionización que ocurre durante la CG/EM. El análisis de masas del ion hija por el segundo analizador de masas provee una identificación particular y altamente específica del ion madre objeto de estudio.

La Fig. 8-13 muestra el esquema de un espectrómetro de masas en tándem. Consiste en dos analizadores de masas conectados secuencialmente. Una cámara de impacto para la fragmentación de los iones seleccionados está situada entre los dos analizadores de masas. Aunque se pueden combinar diferentes tipos de espectrómetros de masas, la configuración cuádruple de triple etapa es una de las más populares. Muchas aplicaciones emplean técnicas de IQ para la ionización inicial generando un fragmento iónico cuasimolecular intenso. El ion seleccionado debe ser tan específico e intenso como sea posible. Este ion se expone a colisiones con un gas inerte en la cámara de colisiones. Los iones hijas resultantes son separados por el segundo analizador de masas. Las líneas espectrales del ion hija semejan líneas de un espectro convencional de IE y se usan para la identificación real del compuesto. La EM/EM genera con efectividad una alta fragmentación característica de un ion específico. En resumen, el primer análisis por EM se usa para lograr la separación de la mezcla en sus componentes, un proceso realizado por el CG en la CG/EM convencional. Con la EM/EM, sin embargo, este proceso de separación es instantáneo, mientras que con la CG/EM puede tomar de 5 a 15 minutos. Esta ventaja de tiempo es la característica que da a la EM/EM su potencial para un análisis muy rápido. Mientras que la salida de las muestras en CG/EM convencional puede ser de 4 a 6 por hora, en EM/EM se pueden hacer 60 muestras por hora. Se alcanza una eficiencia adicional de tiempo ya que se minimizan drásticamente la extracción y la formación de derivados de la muestra, y en algunos casos se evitan totalmente.

Ensayo Forense de Fármacos

En 1987, el Departamento de Servicios Humanos y de Salud encargó al NIDA desarrollar e implementar un programa de acreditación para laboratorios que prueban drogas de abuso en trabajadores del gobierno. Surgió la necesidad de una regulación por el hecho de que distintos laboratorios usaban diversas metodologías y estándares para dar como positivo un resultado de análisis de drogas de abuso. La confiabilidad y calidad de los resultados variaba grandemente. Las regulaciones del NIDA [ref\(265\)](#) se publicaron en 1988 y cubrían todos los aspectos del ensayo drogas de abuso. Incluían requerimientos de personal, seguridad de las instalaciones, cadena de custodia, manipulación de muestras, conservación de registros, confidencialidad de los resultados, destreza en las pruebas, control de la calidad (CC), facilidades para la inspección independiente, y requerimientos analíticos para las pruebas. El NIDA ha implementado exitosamente un riguroso programa de acreditación propagando esos estándares. Los laboratorios certificados que fallan en cumplir con esos estándares han perdido la certificación en el programa. El objetivo del programa es asegurar que los laboratorios no den resultados falsos positivos y que los resultados puedan resistir los desafíos legales. En consecuencia, se usa el término ensayo de drogas de abuso “forense”. El protocolo analítico del NIDA para la detección de drogas de abuso en la orina se basa en el uso de dos técnicas analíticas independientes:

- Un procedimiento inicial exploratorio y sensible para identificar especímenes negativos y seleccionar especímenes presuntamente positivos para su posterior ensayo. Se tiene que hacer la exploración usando una técnica de inmunoensayo registrada por la FDA.
- Una técnica confirmatoria altamente específica que al menos es tan sensible como la exploración inicial para la confirmación de resultados presuntamente positivos. Se adoptó la CG/EM como método confirmatorio.

Tanto los métodos exploratorios como los de confirmación están incorporados en un programa forense de detección de drogas en la orina, donde las consecuencias de tal análisis serían la base para tomar medidas contra el individuo a quien se tomó la muestra. [ref\(266\)](#) Debido al efecto potencialmente negativo para el individuo, sólo se usan procedimientos rigurosos y concluyentes. La CG/EM se acepta generalmente como una técnica rigurosa de confirmación, ya que provee el mejor nivel de confianza en el resultado. Acerca de la sustentabilidad legal del análisis de laboratorio, una encuesta efectuada a expertos, revisores de la industria, y toxicólogos forenses concluyó que “la mayoría de los expertos forenses creen que la CG/EM es el estándar de oro y los expertos que tienen que defender los datos analíticos son de la opinión de que la confirmación por CG/EM se mantiene como el procedimiento de confirmación más sustentable por un margen considerable.” [ref\(267\)](#) Otros programas de ensayos forenses de drogas en el puesto de trabajo se han instituido también por varias localidades estatales y municipales (como la Florida, el estado de New York, la comunidad de Pensilvania, y la ciudad de New York). El Colegio de Patólogos Americanos junto con la Asociación Americana de Químicos Clínicos han implementado también un programa voluntario de acreditación para el ensayo forense de drogas en orina. Analíticamente, todas siguen el modelo del NIDA requiriendo confirmación de una exploración inicial positiva por inmunoensayo. Es bueno recordar que la CG/EM es una técnica que combina la separación



por CLG con la detección por espectrometría de masas. Esto significa que unos buenos resultados de CG/EM dependen grandemente de buenas separaciones cromatográficas. Aunque pueda parecer evidente, muchos usuarios de la CG/EM hallan problemas que pudieran ser fácilmente evitados al optimizar los parámetros cromatográficos. De hecho, la mayoría de los problemas en la CG/EM en el laboratorio clínico y de toxicología forense son probablemente de naturaleza cromatográfica. Entonces es importante considerar la cromatografía, así como la limpieza de la muestra de orina y los aspectos relacionados con la formación de derivados, en cualquier discusión de la aplicación de CG/EM a cualquier ensayo de drogas en fluidos biológicos. Para algunas de las drogas reguladas por el NIDA, la obtención de derivados es necesaria para incrementar la volatilidad del compuesto y optimizar el proceso de cromatografía. Grupos reactivos como los hidroxilos, ácidos carboxílicos, y aminos se convierten en grupos funcionales menos reactivos por medio de la formación de derivados. Esto aumenta su volatilidad y minimiza su reactividad cromatográfica dando como resultado un mejor comportamiento cromatográfico, así como una separación más rápida. La formación de derivados también incrementa el peso molecular de los compuestos e incrementa por tanto la especificidad generando más fragmentos iónicos de alta m/z . Algunas discusiones de buena profundidad sobre las técnicas de obtención de derivados y artículos relacionados están fácilmente disponibles.[refs\(268\)](#) Los estándares internos deuterados deben ser utilizados y deben ser adicionados a las muestras biológicas bajo ensayo antes del proceso de extracción. Dos malentendidos ampliamente extendidos son (1) que la CG/EM es un “método” específico y (2) que la CG/EM es 100% segura. La CG/EM es de hecho una técnica analítica instrumental con muchas variaciones de posibilidades de configuración instrumental. Hay incontables métodos basados en técnicas de CG/EM, cada uno con sus propias ventajas y desventajas. Algunos métodos de CG/EM pueden ser apropiados para un compuesto analizado dado, mientras que otros tal vez no lo sean. Aunque a los laboratorios de ensayo forense se les pide utilizar la CG/EM, ellos tienen gran flexibilidad y libertad en la selección de la instrumentación, modo de operación, así como la metodología analítica real. Cuando un método apropiado se realiza correctamente, resultará en la identificación positiva de una droga o metabolito. El resultado será legalmente sustentable si un adecuado control de calidad es parte del análisis de laboratorio. El programa de control de calidad debe incluir el análisis de estándares en los umbrales de corte, muestras libres de drogas, controles ciegos, y controles conocidos conteniendo drogas por encima y por debajo del valor del umbral con cada lote de muestras. En adición, los requerimientos forenses dictan una estricta cadena de custodia y seguridad del laboratorio. Tales requerimientos son parte del paquete forense y son necesarios debido a las implicaciones de los resultados de pruebas de laboratorio para aspirantes a plazas, empleados, y compañías debido a los potenciales desafíos legales de los resultados de laboratorio. Cuando todos esos aspectos de la prueba están incorporados, los resultados de laboratorio son legalmente sustentables.

Referencias

1. McFadden WH: *Techniques of combined gas chromatography/mass spectrometry*, New York, 1973, Wiley & Sons.



2. Saferstein R: *Forensic science handbook*, Englewood Cliffs, N.J., 1982, Prentice-Hall, pp 92-182.
3. Jindal SP, Vestergaard P: Quantitation of cocaine and its principal metabolite, benzoylecgonine, by GLC/mass spectrometry using stable isotope labeled analogues as internal standards, *J Pharm Sci* 67:811-814, 1978.
4. McLafferty FW: *Interpretation of mass spectra*, ed 3, Mill Valley, Calif., 1980, University Science Book.
5. Silverstein RM, Bassler CG: *Spectrometrical identification of organic compounds*, New York, 1967, Wiley & Sons.
6. Budzikiewicz H, Djerassi C, Williams DH: *Mass spectrometry of organic compounds*, San Francisco, 1967, Holden-Day Inc.
7. Lehrer M: Application of gas chromatography/mass spectrometry instrument techniques to forensic urine drug testing, *Clin Lab Med* 10:271-288, 1990.
8. Hewlett-Packard technical application: *GC/MS confirmation of amphetamines*, publication #23-5954-8146, Waltham, Mass., Jan 1987, Hewlett-Packard Co.
9. deJong EG, Maes RA, van Rossum JM: *Why do doping control labs need MS/MS?* Presented at the International Symposium on Applied Mass Spectrometry in the Health Sciences, Barcelona, Spain, Sept 28, 1987.
10. Deutsch DG: *Analytical aspects of drug testing, chemical analysis series*, New York, 1989, Wiley & Sons, pp 87-128.
11. Pflieger K, Maurer H, Weber A: *Mass spectral and GC data of drugs, poisons, and their metabolites*, New York, 1985, VCH Publishers.
12. Peat MA: Analytical and technical aspects of testing for drug abuse: confirmatory procedures, *Clin Chem* 34(3):471-473, 1988.
13. Iribane JV, Thomson BA: On the evaporation of small ions from charged droplets, *J Chem Physiol* 64:2287, 1976.
14. Bruins AP, Covey TR, Henion JD: IonSpray interface for combined liquid chromatography/atmospheric pressure ionization mass spectrometry, *Anal Chem* 59:2642-2646, 1987.
15. *The API book*, Eden Prairie, Minn., 1992, Perkin-Elmer Sciex.
16. Lehrer M, Karmen A: Chemical ionization mass spectrometry for rapid assay of drugs in serum, *J Chromatogr* 126:615-624, 1976.
17. Saferstein R: Drug detection in urine by chemical ionization mass spectrometry, *J Forensic Sci* 23:29-39, 1978.
18. Yost RA, Johnson JV: Tandem mass spectrometry for trace analysis, *Anal Chem* 57(7):758A-768A, 1985.
19. Glish GL, Shaddock VM, Harmon K: Rapid analysis of complex mixtures by mass spectrometry, *Anal Chem* 52:165-167, 1980.
20. Lee MS, Yost RA: Rapid identification of drug metabolites with tandem mass spectrometry, *Biomed Environ Mass Spectrometry* 15:193-204, 1988.
21. Weiss MD: Chemistry is winning the war against crime, *Industrial Chemist* 15:28-34, Feb 1988.
22. Federal Register: *Mandatory guidelines for federal workplace drug testing; final guidelines*, April 11, 1988.
23. Lehrer M: Drug screening in the workplace, *Clin Lab Med* 7(2):389-400, 1987.
24. Hoyt DW, Finnigan RE, Nee T, et al: Drug testing in the workplace: are methods legally defensible? *JAMA* 258(4):504-509, 1987.
25. Blau K, King GS, editors: *Handbook of derivatives for chromatography*, Philadelphia, 1978, Heyden & Sons.
26. Foltz RL, Fentiman AF, Foltz RB: *GC/MS assays for abused drugs in body fluids*, National Institute of Drug Abuse monogr no 32, DHHS publ no (ADM) 80-1014, Washington, D.C., 1980.
27. Hawks RL, Chiang CN: *Urine testing for drugs of abuse*, National Institute of Drug Abuse monogr. no 73, DHHS publ no (ADM) 87-1481, Washington, D.C., 1987.

Figuras

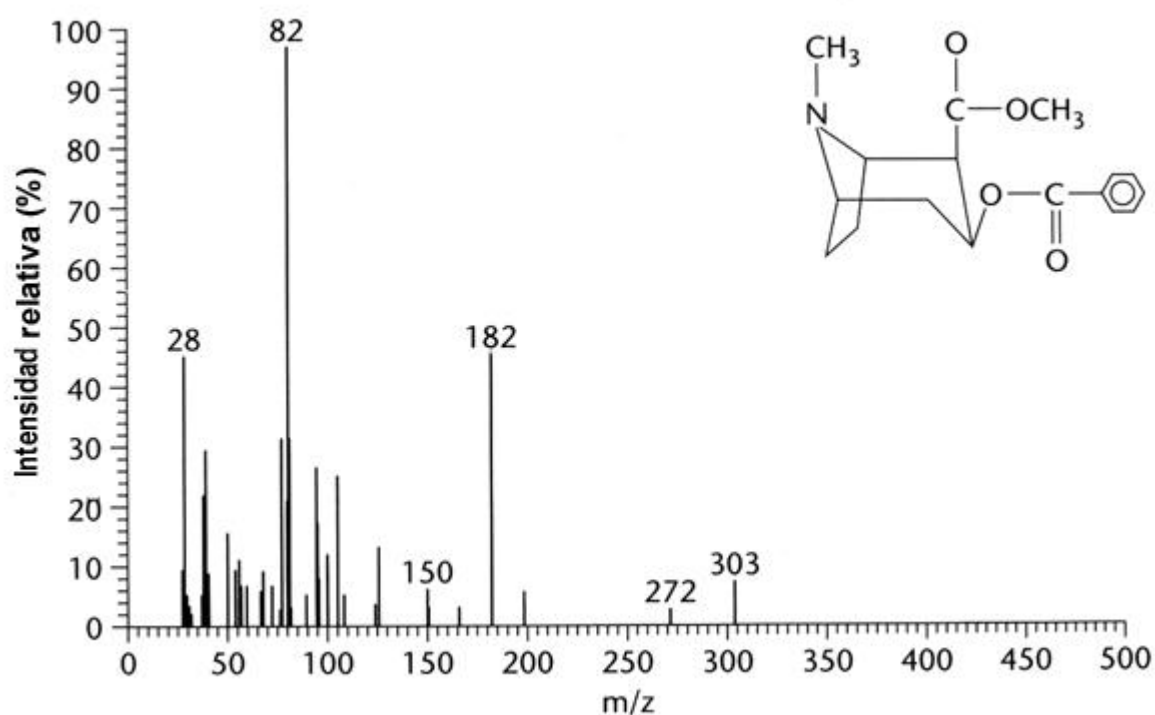


Figura 8-1 Espectro de masas por impacto electrónico de la cocaína (De: Saferstein R: *Forensic science handbook*, Englewood Cliffs, N.J., 1982, Prentice Hall.)

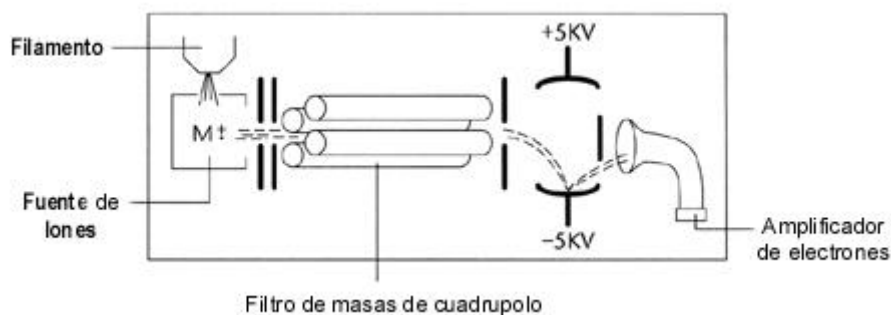


Figura 8-2 Espectrómetro de masas con analizador cuadrupolar.

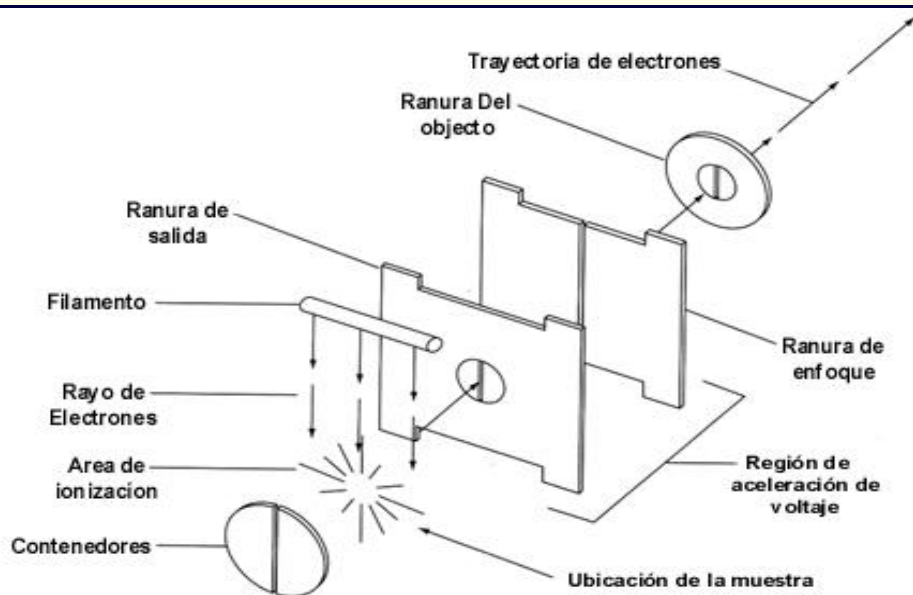


Figura 8-3 Esquema de una fuente de iones. (De: Saferstein R: *Forensic science handbook*, Englewood Cliffs, N.J., 1982, Prentice Hall.)

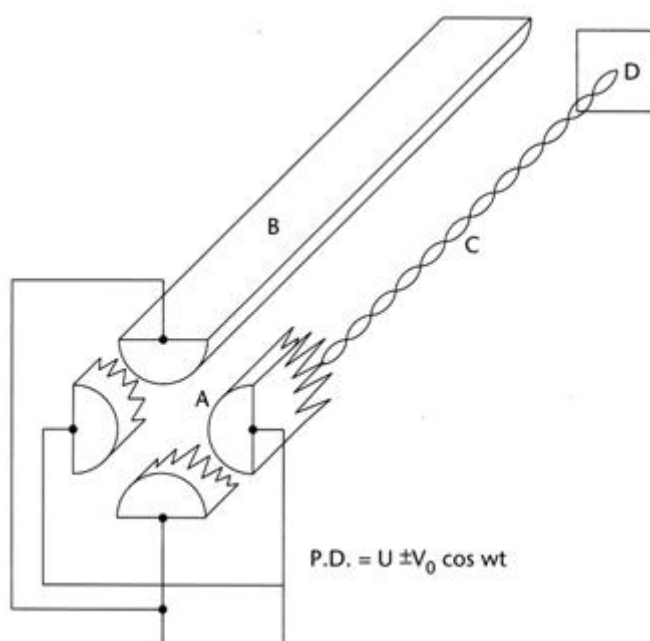


Figura 8-4 Esquema de un filtro de masas con cuadrupolo. A, Inyección del ion; B, varillas en cuadrupolo; C, haces iónicos oscilantes; D, colector (De: McFadden WH: *Techniques of combined gas chromatography/mass spectrometry*, New York, 1973, Wiley & Sons.)

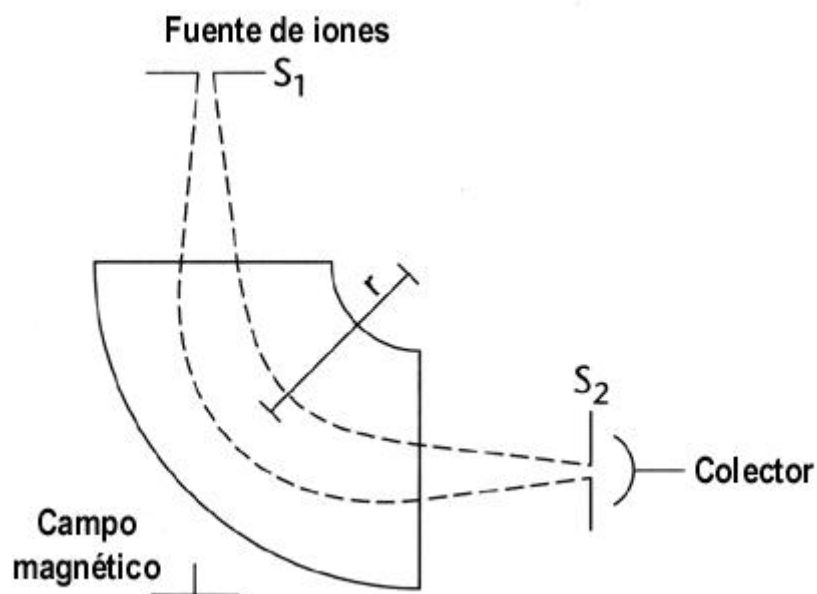


Figura 8-5. Esquema de un sector magnético de 90 grados mostrando el enfoque de la dirección de un haz iónico divergente. (De: McFadden WH: *Techniques of combined gas chromatography/mass spectrometry*, New York, 1973, Wiley & Sons.)



Figura 8-6 Ionización electrónica. *F*, Fragmento; *M*, molécula; *M*⁺, ion molecular.

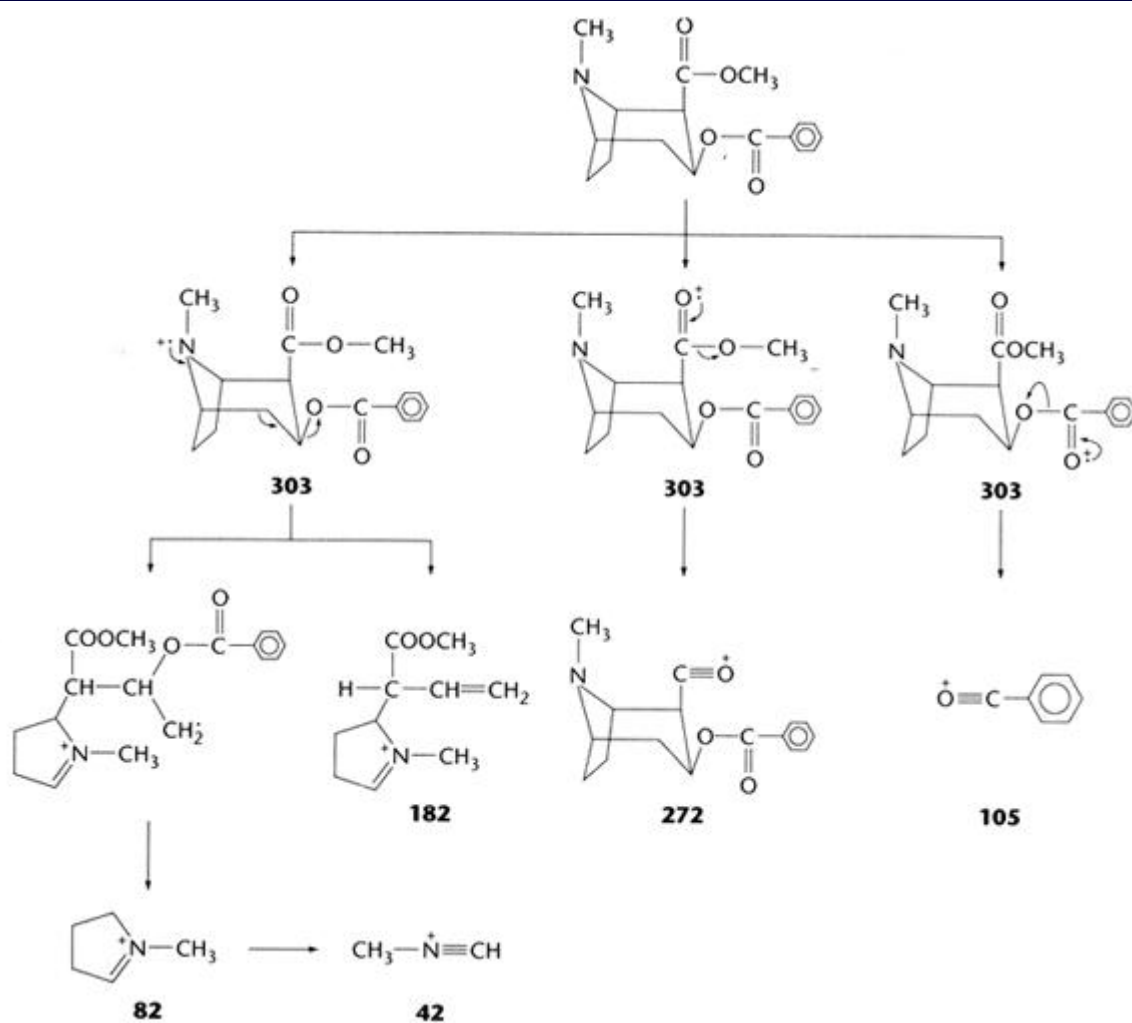


Figura 8-7 Patrón de fragmentación de la cocaína.

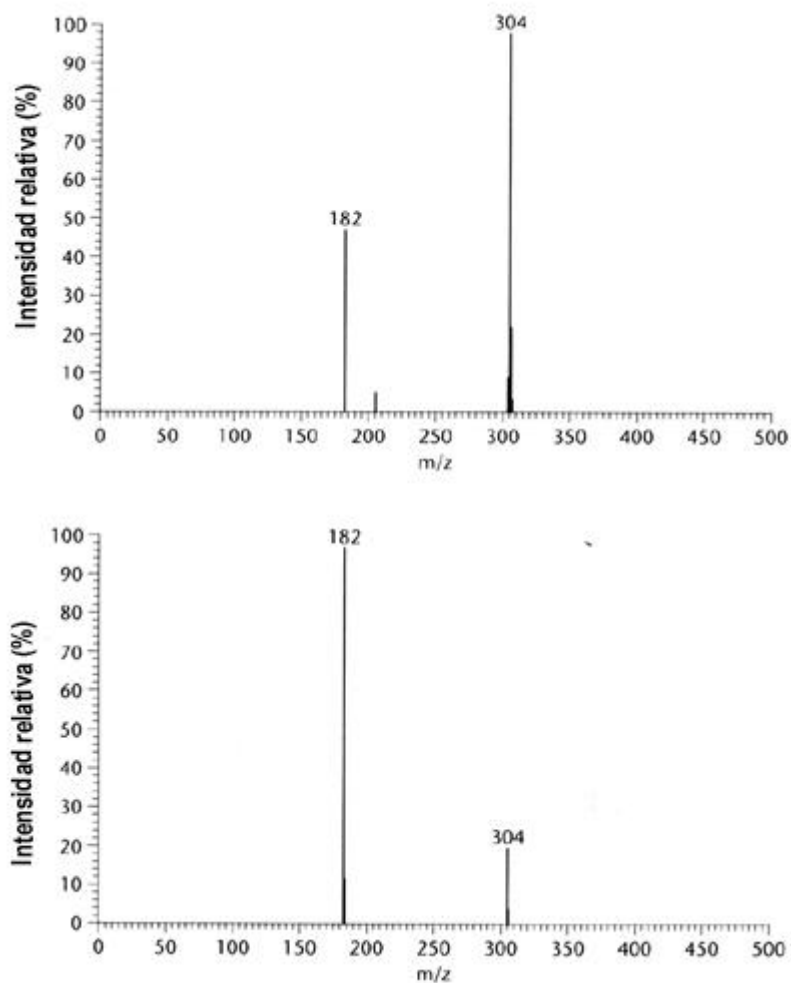


Figura 8-8 A, Espectro por ionización química del isobutano de la cocaína. B, Espectro por ionización química del metano de la cocaína.

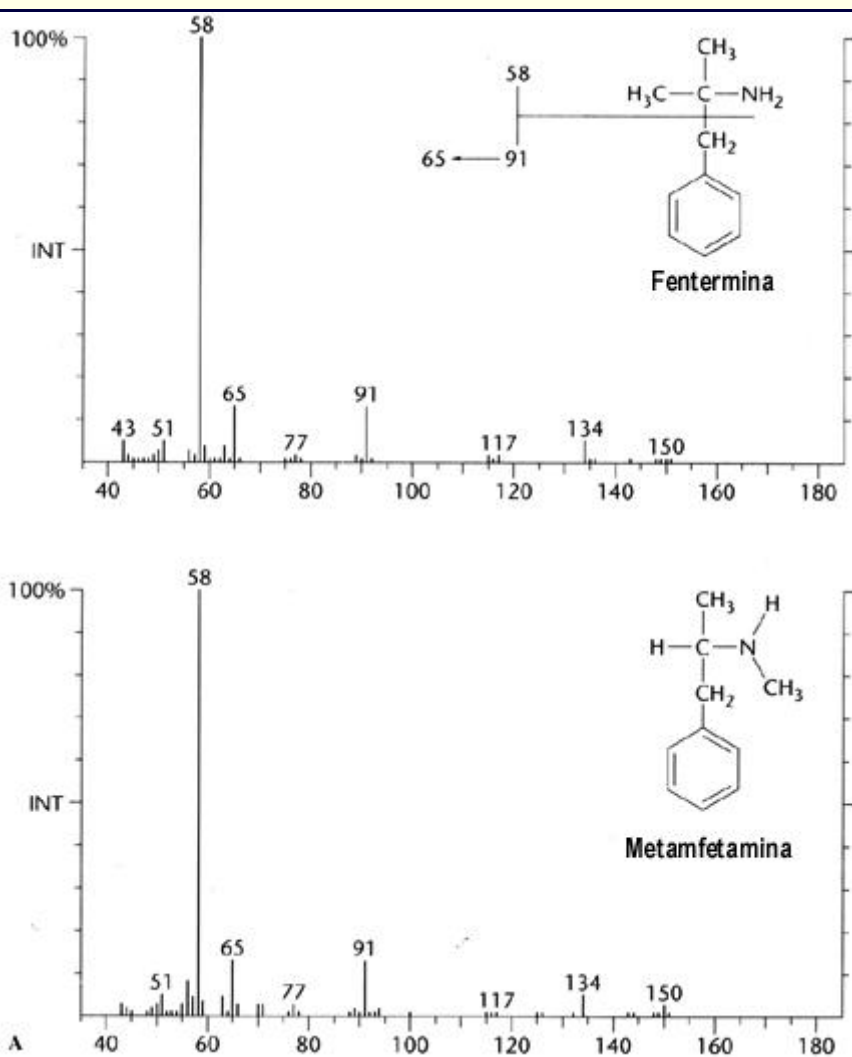


Figura 8-9 A, Espectros de barrido total por ionización electrónica (IE) de la fentermina y metamfetamina. Los dos compuestos presentan espectros de masas IE virtualmente idénticos (realizado con un Finnigan-Mat ITS 40 CG/EM).

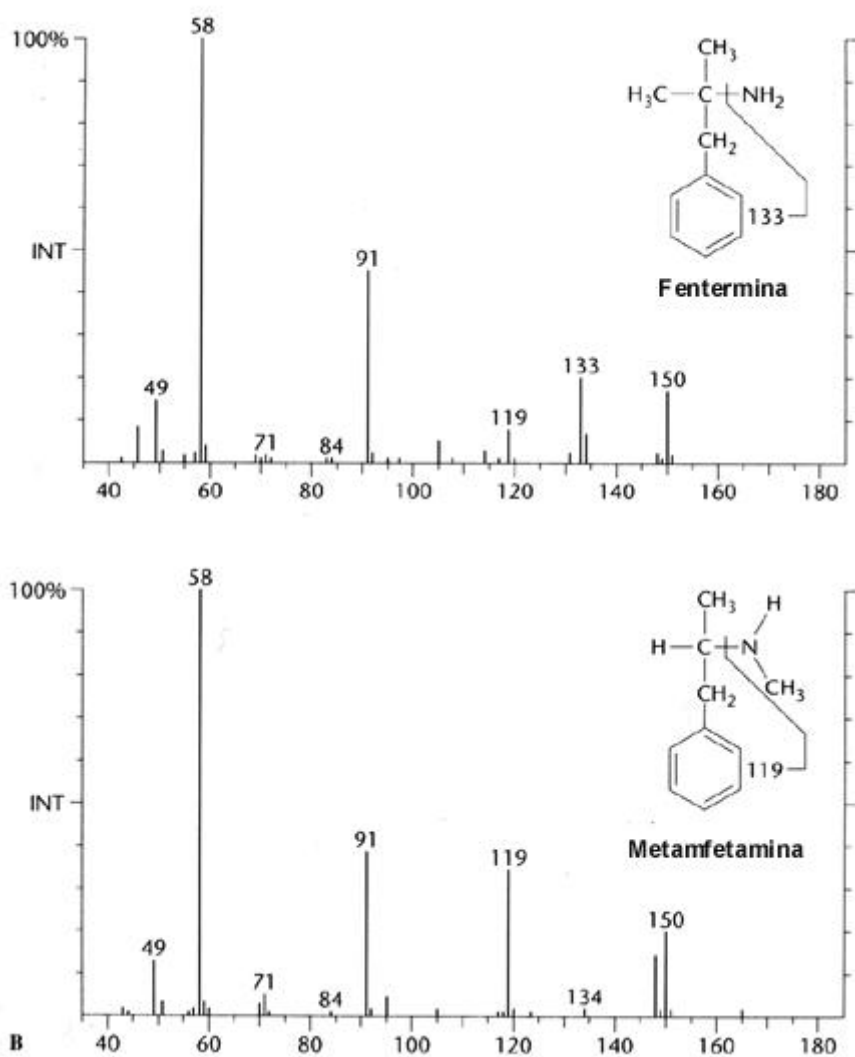


Figura 8-9 B, Espectros de barrido total por ionización química (IQ) de la fentermina y metamfetamina (realizado con un Finnigan-Mat ITS 40 CG/EM).

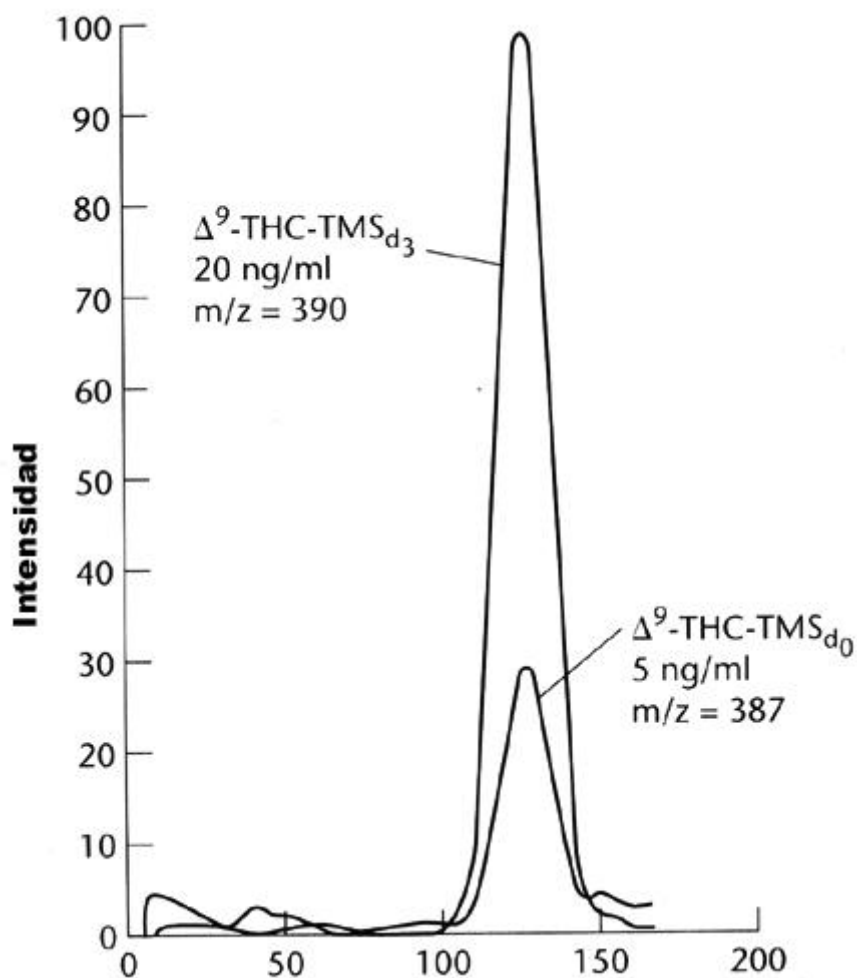


Figura 8-10 Monitoreo de ion seleccionado graficado para la cuantificación de D^9 -tetrahidrocanabinol en plasma. Fármaco no deuterados (d_0) y deuterado (d_3). (De: Saferstein R: *Forensic science handbook*, Englewood Cliffs, N.J., 1982, Prentice Hall.)

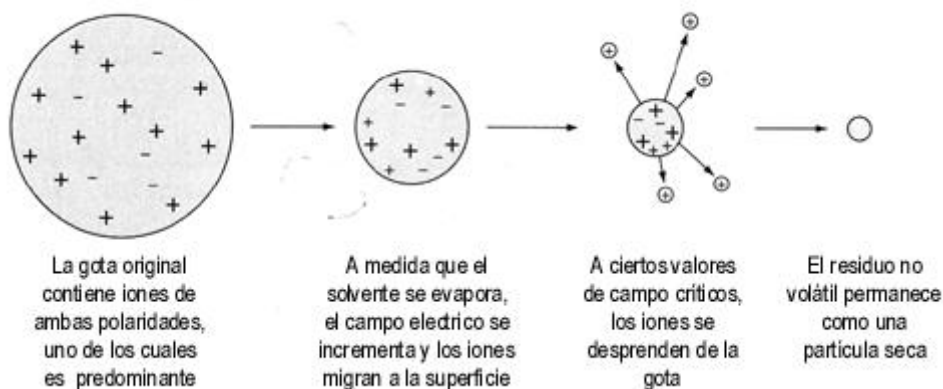


Figura 8-11 Diagrama del proceso de evaporación iónica. (De: *The API book*, Eden Prairie, Minn., 1992, Perkin-Elmer Sciex.)

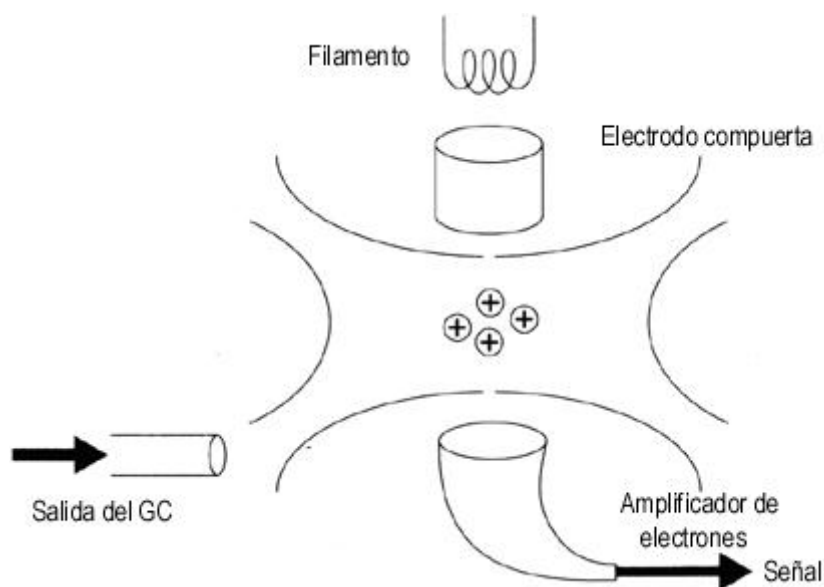


Figura 8-12 Espectrómetro de masas con trampa de iones.

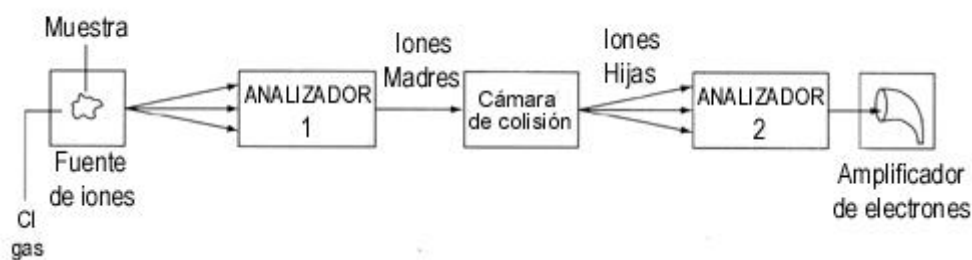


Figura 8-13 Esquema de un espectrómetro de masas en tándem (EM/EM). IQ, Ionización Química. (De: Yinon Y: *Forensic mass spectrometry*, Boca Raton, Fla., 1987, CRC Press.)



CAPÍTULO 9

9. Radioisótopos en Química Clínica

I-Wen Chen

Estructura básica de un átomo

- Partículas fundamentales de un átomo
- Nomenclatura de la estructura atómica

Principios de la radiación y radiactividad

- Radiación nuclear
- Energía de radiación
- Tasa de desintegración radiactiva
- Propiedades de la radiación e interacción con la materia

Medición de la radiación nuclear

- Detectores cargados con gas
- Detectores de centelleo

Salud y seguridad referentes a la radiación

- Monitoreo
- Control de la contaminación
- Eliminación de desechos

OBJETIVOS

- Describir la estructura básica del átomo. Explicar la importancia del número atómico y el número de masa atómico, y como se relacionan con la existencia de los isótopos.
- Describir las formas de la desintegración radiactiva asociada con tritio, carbono-14 y yodo-125 y mencionar las partículas emitidas.
- Definir y explicar la importancia de las constantes de desintegración, factores de desintegración, vida media y actividad específica.
- Resumir la operación de los detectores de centelleo. Ilustrar mediante un diagrama y explicar el uso de los contadores de centelleo líquido y de cristal, así como describir la operación de cada componente. Definir “atenuación” y delinear los métodos de corrección.
- Describir el uso de los isótopos en los laboratorios clínicos y enumerar las consideraciones de seguridad radiológica para el monitoreo del personal y las áreas de trabajo, de control de la contaminación, y eliminación de desechos.

Términos clave

abundancia isotópica Cantidad de isótopos presentes de un elemento dado.

actividad específica Actividad del radionucleido (o radionúclido) por unidad de masa de la muestra radiactiva, expresada en curies (Ci) por μg , μCi por mol, etc.

becquerel (Bq) En el Sistema Internacional de Unidades (SI) es la unidad de radiactividad correspondiente a una velocidad de declinación de 1/seg ($Bq = 1 \text{ seg}^{-1} = 2.7 \times 10^{-11} \text{ Ci}$). Ver curie.

captura electrónica Forma de declinación radiactiva en que los nucleidos pobres en neutrones declinan a través de la captura de electrones de las órbitas más cercanas al núcleo produciendo una emisión característica de rayos x.

circuito anticoincidente Circuito utilizado en el analizador de altura de pulsos de un contador de partículas radiactivas para fijar la anchura de ventana (ver ventana). Este arreglo transmite un pulso que llega a su entrada proveniente del discriminador bajo sólo si no existe un pulso que llegue del discriminador alto al mismo tiempo (ver discriminador).

circuito coincidente Circuito usado en un contador de centelleo líquido para eliminar el ruido electrónico. Este arreglo determina si un pulso de un tubo fotomultiplicador está acompañado de un pulso correspondiente proveniente del otro dentro del intervalo de tiempo permitido (ver tiempo de resolución de coincidencia).

constante de declinación Constante única para cada nucleido radiactivo (ver nucleido) que representa la proporción de átomos en una muestra de ese radionucleido experimentando declinación por unidad de tiempo.

curie Unidad de radiactividad. Un curie está definido como la actividad de una muestra que declina a una velocidad de 3.7×10^{10} desintegraciones por segundo (dps).

desplazador de longitud de onda Centellador secundario agregado al líquido de centelleo para desplazar la longitud de onda emitida por el centellador primario a fin de lograr una detección más eficiente de los fotocatodos de los fototubos multiplicadores en el conteo de centelleo líquido.

discriminador(es) Aparato(s) usado(s) en el analizador de altura de pulsos de un contador de partículas radiactivas para fijar los límites de voltaje del nivel superior (discriminador de nivel superior) y el inferior (discriminador de nivel inferior) a fin de realizar el conteo.

dosis de radiación absorbida (rad) Medida de la deposición de energía local por unidad de masa de material irradiado. Un rad es igual a 100 ergios de energía absorbida por gramo de material absorbente. (No existe forma en plural).

electrón voltio (eV) Unidad básica de energía usada comúnmente en radiación, definida como la cantidad de energía adquirida por un electrón cuando es acelerado mediante un potencial eléctrico de 1 voltio.

equivalente roentgen, humano (rem) La dosis de cualquier radiación ionizante causante de la misma cantidad de daño biológico al tejido humano que un rad de radiación x, gama o beta. En el caso de radiación x, gama o beta el rem es igual a la dosis absorbida en rad; en el caso de radiación alfa, sin embargo, la dosis en rem es igual a la dosis en ram multiplicada por 20, ya que sólo 0.05 rad de radiación alfa se necesita para producir el mismo efecto biológico que 1 rad de radiación x, gama o beta. (No tiene forma plural).

factor de declinación La fracción de radionucleidos que permanecen después de un tiempo, t.

ionización específica Número de pares de iones producidos por unidad de longitud de trayectoria recorrida de la radiación ionizante.

isobar Nucleido (ver nucleido) con el mismo número de masa atómica pero con diferente número atómico.

isótopo Nucleido (ver nucleido) con el mismo número atómico pero con diferente número de



masa atómica.

nucleido Núcleo con un número de masa atómica y número atómico particular.

nucleón Término colectivo para designar los protones y neutrones en el núcleo.

quimioluminiscencia Producción de fotones luminosos por una interacción del material de la muestra con el soluto o solubilizador adicionado a la solución de centelleo en el conteo de centelleo líquido.

roentgen (R) Unidad de rayos x o gama que representa la cantidad de ionización producida por radiación fotónica en una muestra de aire dada. Un roentgen a la cantidad de radiación fotónica capaz de producir una unidad electrostática de iones de cualquier signo en 0.001293 g de aire.

tiempo de resolución de coincidencia Intervalo de tiempo en el cual los pulsos de salida de cada tubo fotomultiplicador de un contador de centelleo líquido tienen que llegar al circuito coincidente para ser contados.

transmutación Proceso de declinación radiactiva que conduce a un cambio en la constitución nuclear, como la declinación por captura de electrones (ver captura electrónica).

ventana Límite de voltaje fijado por los discriminadores de nivel inferior y superior (ver discriminador) del analizador de altura de pulsos de un contador de partículas radiactivas para conteo diferencial.

vida media ($t_{1/2}$) Tiempo requerido para que un número de radionucleidos disminuya a la mitad de su valor original.

El uso de isótopos, estables y radiactivos, ha proporcionado gran cantidad de información en el campo de las ciencias médicas, gran parte de la cual no podría haberse obtenido de otro modo. La utilidad de los isótopos depende del hecho de que los isótopos de un elemento poseen idénticas propiedades químicas pero diferentes propiedades isotópicas, como radiactividad y mayor masa, y del hecho de que las propiedades isotópicas y las propiedades químicas de un elemento son independientes entre sí. En consecuencia, la sustitución de un átomo en la molécula de una sustancia por otros isótopos no altera químicamente dicha sustancia, y las propiedades isotópicas de los isótopos incorporados a la sustancia permanecen inalteradas. Las propiedades isotópicas hacen a la sustancia más fácilmente identificable. Por ejemplo, la tiroxina es una hormona tiroidea que contiene cuatro átomos de yodo. Uno de estos átomos de yodo puede ser reemplazado por yodo radiactivo sin alteración apreciable de sus propiedades químicas y los átomos del radioyodo incorporados a las moléculas de tiroxina mantienen su radiactividad característica. Las tiroxinas marcadas con yodo radiactivo se utilizan en varias pruebas de la función tiroidea.

La aplicación de compuestos marcados radioisotópicamente en química clínica se ha extendido en gran medida desde el advenimiento de los radioinmunoanálisis (RIA), en los cuales se determina la cantidad de antígeno unido al anticuerpo midiendo la radiactividad (ver Capítulos 12 y 13). El uso de los radioisótopos en los laboratorios clínicos, sin embargo, ha estado disminuyendo en años recientes debido a la aparición de la tecnología automatizada de inmunoensayos no isotópicos, y las técnicas radioinmunológicas tendrán funciones más limitadas en el campo de los inmunoensayos para el diagnóstico rutinario de enfermedades. En este capítulo, se tratan algunos principios básicos involucrados en la medición de los isótopos.



Estructura Básica de un Átomo

Partículas fundamentales de un átomo

Un átomo es la unidad más pequeña de materia que aún presenta las propiedades químicas de un elemento. Los componentes principales que constituyen los átomos, el electrón, el protón y el neutrón, se denominan partículas elementales. De acuerdo al modelo planetario del átomo desarrollado por Rutherford en 1911, el átomo consiste de un pequeño cuerpo central cargado positivamente (el núcleo, compuesto de neutrones y protones) alrededor del cual se mueven en órbitas definidas los electrones cargados negativamente. Aunque el modelo de Rutherford está muy simplificado, se puede usar para explicar satisfactoriamente muchos fenómenos atómicos. En la Fig. 9-1 se ilustra el modelo planetario de un átomo de carbono. El núcleo de carbono contiene seis protones y seis neutrones. Dado que los átomos completos son eléctricamente neutros, en el átomo de carbono hay seis electrones en órbita que neutralizan los seis protones del núcleo. Los electrones se mueven alrededor del núcleo en una serie de órbitas, a distancias variables del núcleo, en gran medida como los planetas del sistema solar que viajan en diferentes órbitas a distancias variables del sol. Las órbitas se denominan K, L, M, etc., comenzando a partir de la más interna. Sólo dos electrones pueden acomodarse en la órbita K; la órbita L del átomo de carbono contiene los cuatro restantes.

Las diferencias físicas y químicas entre los átomos de diferentes elementos dependen del número de protones y neutrones contenidos en el núcleo atómico, que determina la masa y la carga del núcleo y el número y disposición de los orbitales electrónicos, que determinan las propiedades químicas de los elementos

Nomenclatura de la estructura atómica

Existen varios términos importantes que son útiles para entender la estructura del atómica:

nucleón Término colectivo que designa los protones y neutrones dentro del núcleo.

número atómico, Z Número de protones en el núcleo.

número de masa atómica, A Número total de nucleones dentro del núcleo.

número neutrónico, N Número de neutrones dentro del núcleo.

nucleido Núcleo con números Z y A particulares.

elemento, E Núcleo con número Z determinado

isótopo Nucleidos con el mismo número Z pero diferentes números A (diversas especies nucleares del mismo elemento).

isobaros Nucleidos con el mismo número A pero diferente número Z (diferentes elementos con la misma masa atómica).

El número de masa se representa como un superíndice a la izquierda y el número atómico como un subíndice a la izquierda (aquí representado a la derecha) del símbolo químico. Así, un elemento E se escribe ${}^A_Z E$. El isótopo estable natural más abundante del



carbono tiene seis protones y seis neutrones en el núcleo, como se indica en la Fig. 9-1. El número atómico, Z , es por lo tanto 6; el número de masa ($A = Z + N$) es 12 y todo el átomo puede describirse como $^{12}\text{C}_6$. El otro isótopo natural, pero menos abundante, del carbono es $^{13}\text{C}_6$, que contiene siete neutrones en el núcleo. El $^{12}\text{C}_6$ y el $^{13}\text{C}_6$ son isótopos estables del carbono, ninguno de los cuales es radiactivo. El isótopo radiactivo más conocido del carbono es el $^{14}\text{C}_6$, que contiene seis protones y ocho neutrones. Ejemplos de otros grupos de isótopos de un elemento comúnmente utilizados en química clínica son $^1\text{H}_1$, $^2\text{H}_1$, $^3\text{H}_1$ y el $^{125}\text{I}_{53}$, $^{127}\text{I}_{53}$ y $^{131}\text{I}_{53}$. El $^1\text{H}_1$ es el isótopo natural más abundante del hidrógeno y tiene un protón en el núcleo pero ningún neutrón. El $^2\text{H}_1$ es un isótopo estable del hidrógeno, conocido como deuterio porque su núcleo contiene dos partículas nucleares, un protón y un neutrón. El $^3\text{H}_1$, denominado tritio, es un isótopo radiactivo del hidrógeno formado por la combinación de un protón y dos neutrones. Todos los isótopos del hidrógeno tienen un solo electrón circundante y por ende poseen idénticas propiedades químicas; no obstante sus propiedades físicas son diferentes. Por ejemplo, tienen diferentes puntos de ebullición y congelación. En el caso del tritio, su núcleo es inestable y, como se discute más adelante, sufre transiciones radiactivas, transformándose en un núcleo diferente y estable; el núcleo del helio. El isótopo natural estable del yodo es el $^{127}\text{I}_{53}$. Los otros dos isótopos del yodo mencionados son radiactivos, con diferente número de neutrones en su núcleo, como lo indican sus números de masa. En muchos casos, el subíndice que indica el número atómico es redundante porque el número atómico y el símbolo químico identifican la especie química. Por consiguiente, excepto en algunas ecuaciones que describen reacciones nucleares, el subíndice normalmente se omite (como en ^{14}C , ^3H , ^{125}I).

Principios de Radiación y Radiactividad

Radiación nuclear

La liberación de materia o energía durante la transformación de un átomo inestable en un átomo más estable se denomina radiación nuclear. El número y disposición de los protones y neutrones en el núcleo de un átomo determina si el núcleo es estable o inestable.

Estabilidad nuclear.

Entre los nucleidos estables existen relaciones neutrón a protón favorecidas. En los nucleidos livianos dicha relación es cercana a la unidad. Cuando el número de masa es superior a 40, no existen nucleidos estables con igual número de protones y neutrones porque, a medida que aumenta el número de protones, aumentan las fuerzas coulómbicas de repulsión entre los protones en mayor grado que las fuerzas nucleares de atracción. Por lo tanto se requiere la adición de neutrones a fin de aumentar la distancia promedio entre los protones del núcleo para reducir las fuerzas eléctricas. En los núcleos pesados, la relación neutrón/protón es 1.5 o mayor. Por ejemplo, el isótopo estable más pesado del plomo, ^{208}Pb , posee una relación neutrón/protón de 1.53.

La Fig. 9-2 ilustra la relación entre el número de neutrones y protones de los nucleidos estables. A partir de una curva neutrón/protón se puede obtener una línea imaginaria



denominada línea de estabilidad, representada en la gráfica por una línea punteada; los nucleidos estables están agrupados alrededor de dicha línea. Los nucleidos deficientes en protones se hallan por debajo de la línea de estabilidad y son inestables. Los nucleidos deficientes en neutrones se sitúan por encima de la línea y son también inestables. La gráfica ilustra también el hecho de que a medida que los nucleidos se vuelven más pesados, se requieren más neutrones para mantener la estabilidad.

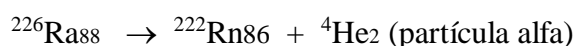
Además de la relación neutrón/protón favorecida, los nucleidos estables tienden a favorecer los números pares. Por ejemplo, 168 de los aproximadamente 280 nucleidos estables conocidos poseen números pares de neutrones y protones, lo cual refleja la tendencia de los nucleidos a alcanzar configuraciones estables apareando los nucleones en el núcleo.

Formas de declinación radiactiva

Los nucleidos inestables se transforman generalmente en nucleidos estables mediante uno de los procesos de declinación radiactiva que se describen a continuación.

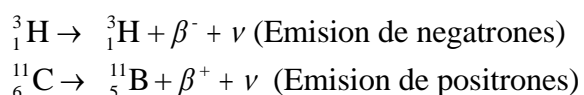
Declinación por emisión de partículas alfa.

Una partícula alfa (α) consiste en dos protones y dos neutrones y es esencialmente un núcleo de helio. Los nucleidos pesados que deben perder masa para lograr estabilidad nuclear frecuentemente declinan por emisión de partículas alfa, debido a que dicha emisión es un medio efectivo para reducir el número de masa. La emisión de una partícula alfa remueve dos protones y dos neutrones del núcleo, produciendo una reducción del número atómico en 2 y del número de masa en 4. Los nucleidos radiactivos muy pesados que declinan con emisión de partículas alfa son de escaso interés en química clínica. Un ejemplo de declinación por emisión de partículas alfa es el siguiente:



Declinación por emisión de partículas beta.

Las partículas beta (β) son electrones cargados negativamente (negatrones, β^-) o positivamente (positrones, β^+). Los nucleidos deficientes en protones, que se encuentran por debajo de la línea de estabilidad (Fig. 9-2), suelen decaer por emisión de negatrones debido a que su forma de declinación convierte un neutrón en un protón, desplazando al núcleo más cerca de la línea de estabilidad. Los nucleidos deficientes en neutrones que se hallan por encima de la línea de estabilidad generalmente decaen por emisión de positrones, ya que esta forma de declinación transforma un protón en un neutrón. Esquemáticamente, estas formas de declinación radiactiva pueden representarse mediante las siguientes ecuaciones:



Las partículas beta y el neutrino (ν) expulsados del núcleo, se llevan la energía liberada en el proceso de declinación como energía cinética. El neutrino es una partícula sin masa ni carga eléctrica y prácticamente no interacciona con la materia. La única consecuencia práctica de su



emisión es que se lleva cierta energía liberada en el proceso de decaimiento.

En los procesos de decaimiento por emisión de partículas beta el número de masa no varía debido a que el número total de nucleones dentro del núcleo sigue siendo el mismo. Estos procesos de decaimiento son conocidos como "transiciones isobáricas". Sin embargo el número atómico aumenta en 1 en la emisión de negatrones y disminuye en 1 en la emisión de positrones, produciéndose la transmutación de los elementos (conversión de un elemento en otro). A continuación se presentan algunos ejemplos de decaimiento por emisión de partículas:



Decaimiento por captura electrónica.

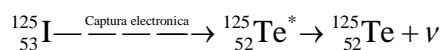
Además de la decaimiento por emisión de positrones, los nucleidos deficientes en neutrones pueden decaer por captura electrónica, transformando un protón en un neutrón. Por ello la captura electrónica se denomina a veces decaimiento inverso de negatrones. Es asimismo una transición isobárica que conduce a la transmutación de los elementos. En el proceso de captura electrónica, el electrón es capturado de órbitas más cercanas al núcleo, o sea K y L (capturas K y L; ver Fig. 9-1). El vacío orbital creado por la captura electrónica es rápidamente llenado por el electrón de una órbita superior, produciendo la emisión de un rayo X característico:



El núcleo hijo formado mediante este tipo de decaimiento se encuentra a menudo en un estado excitado o metaestable y puede sufrir una decaimiento por emisión de rayos gamma (γ) como se describe a continuación.

Decaimiento por emisión de rayos gamma.

En algunos casos las transiciones isobáricas ya mencionadas (emisión de negatrones, emisión de positrones, captura electrónica) producen un núcleo hijo en estado o metaestable, lo que significa que posee un exceso de energía por encima de la energía mínima posible en su estado fundamental. Este nucleido excitado o metaestable decae rápidamente hacia una configuración nuclear más estable por emisión de rayos gamma, radiación electromagnética de longitud de onda muy corta, como se ilustra en el siguiente ejemplo:



Obsérvese que la emisión gamma no va acompañada por ningún cambio en el número de masa, número de protones ni número de electrones. Por ello se denomina *transición isomérica*:

Radiación extranuclear

En cualesquiera de los procesos de decaimiento radiactivo discutidos anteriormente, se libera una cantidad fija de energía con cada desintegración. La mayor parte o toda la energía liberada aparece como energía cinética de las partículas emitidas o fotones. La unidad básica



de energía comúnmente utilizada en radiación es el electrón voltio (eV). Un electrón voltio se define como la cantidad de energía adquirida por un electrón cuando es acelerado mediante un potencial eléctrico de 1 voltio. Sus múltiplos básicos son el kiloelectrón voltio (keV; 1keV = 1000 eV) y el megaelectrón voltio (MeV; 1MeV = 1000 keV = 1,000,000 eV). En general, la energía de las partículas beta emitidas de los radionucleidos utilizados en clínica es de 18 keV a 3.6 MeV y la de los rayos gama, de 27 keV a 2.8 MeV.

Velocidad de declinación radiactiva

Constante de declinación, factor de declinación y vida media.

La declinación de la radiactividad es un proceso espontáneo, es decir, no es posible predecir cuando va a decaer un determinado átomo radiactivo y la probabilidad de la declinación puede darse sólo sobre una base estadística. Para una muestra que contiene N núcleos radiactivos, el número de núcleos que declinan en un momento dado (dN/dT) puede expresarse de la siguiente manera:

$$dN/dT = -\lambda N \quad \text{Ec. 9-1}$$

En esta ecuación, λ es la constante de declinación del nucleido radiactivo y el signo menos (-) indica que el número de nucleidos radiactivos disminuye con el tiempo. Cada radionucleido posee una constante de declinación característica, que representa la proporción de átomos de una muestra conteniendo dicho radionucleido, que sufre declinación por unidad de tiempo. La constante de declinación, λ , se mide en unidades de (tiempo)⁻¹. Por lo tanto, la equivalencia $\lambda = 0.05 \text{ seg}^{-1}$ significa que, en promedio, cada segundo se desintegra 5% de los radionucleidos. Integrando la ecuación 9-1 obtenemos:

$$N = N_0 e^{-\lambda t} \quad \text{Ec. 9-2}$$

Donde N_0 es el número de radionucleidos presentes al tiempo $t = 0$ y e es la base del logaritmo natural. Por consiguiente, el número de radionucleidos remanentes luego de un tiempo, $t(N)$, es igual al número de radionucleidos al tiempo $t = 0$ (N_0), multiplicado por el factor $e^{-\lambda t}$. Este factor es la fracción de radionucleidos remanentes luego de un tiempo t y se denomina *factor de declinación*. El factor de declinación es una función exponencial del tiempo t ; es decir, una fracción constante del número de radionucleidos presentes en la muestra desaparece durante un determinado intervalo de tiempo. Dicho intervalo se expresa habitualmente como el tiempo requerido para que un número dado de radionucleidos de la muestra disminuya a la mitad de su valor original. Este intervalo de tiempo se denomina *vida media* ($t_{1/2}$). la vida media de un radionucleido está relacionada con su constante de declinación de la manera siguiente:

$$t_{1/2} = 0.693 / \lambda \quad \text{Ec. 9-3}$$

Unidades de radiactividad.

La velocidad promedio de declinación de una muestra (ecuación 9-1), a saber, el



número promedio de nucleidos desintegrados por segundo (dps) o por minuto (dpm), es la actividad de la muestra y se utiliza para determinar la cantidad de radiactividad presente en ésta.

La radiactividad se mide en unidades curie (Ci). Un curie se define como la actividad de una muestra que decae a una velocidad de 3.7×10^{10} dps (2.22×10^{12} dpm), que es muy cercana a la actividad de 1 g de ^{226}Ra . Los múltiplos básicos del curie son los siguientes:

$$\begin{aligned} 1 \text{ Ci} &= 10^3 \text{ millicurie (mCi)} = 10^6 \text{ microcurie (\mu Ci)} \\ &= 10^9 \text{ nanocurie (nCi)} = 10^{12} \text{ picocurie (pCi)} \end{aligned}$$

En química clínica, las cantidades de radiactividad utilizadas son usualmente del orden de nCi a μCi , y en ocasiones se miden cantidades del orden de pCi. Se ha introducido el uso de unidades SI en determinaciones de radiactividad. La unidad básica de esta sistema es el becquerel (Bq); 1 Bq equivale a 1 desintegración por segundo. Por lo tanto:

$$1 \mu\text{Ci} = 3.7 \times 10^4 \text{ Bq}$$

En la ecuación 9-2 N_0 y N son los números de los radionucleidos presentes a tiempos 0 y t respectivamente. Estas cantidades son sumamente difíciles de medir. No obstante, los efectos de las desintegraciones nucleares pueden medirse más fácilmente con el empleo de uno de los detectores radiactivos descritos en las págs. 192 a 197. De este modo, el número total de desintegraciones por segundo que ocurren dentro de la muestra radiactiva, o la radiactividad, pueden ser estimadas en cualquier momento. Dado que la radiactividad A es proporcional al número de átomos N , la ecuación 9-2 puede escribirse:

$$A = A_0 e^{-\lambda t} \quad \text{Ec 9-4}$$

Por lo tanto, la constante de declinación, el factor de declinación y la vida media son también aplicables a la actividad como una función del tiempo.

Con frecuencia es necesario saber la actividad específica de una muestra radiactiva. Es la actividad del radionucleido por unidad de masa de la muestra radiactiva y por ende se mide en μCi por μg , μCi por μmoles , etc., o sus submúltiplos. La actividad específica del nucleido es inversamente proporcional a la vida media del radionucleido y es un factor importante para determinar la sensibilidad de un radioinmunoensayo, RIA. Las actividades específicas de los nucleidos enumerados en la Tabla 9-2 se calculan suponiendo que todos los nucleidos presentes son radiactivos (libres de acarreador). Esta suposición no siempre es cierta. Por ejemplo, la abundancia isotópica de las preparaciones disponibles ^{131}I rara vez excede el 20%; o sea, sólo aproximadamente el 20% de los átomos de yodo presentes en la preparación de ^{131}I es ^{131}I ; el resto es ^{127}I (yodo estable). En consecuencia, la actividad específica de las preparaciones de ^{131}I es de sólo aproximadamente la cuarta parte de la actividad específica teórica que se observa en la Tabla 9-2. Asimismo, la actividad específica de las moléculas depende de la abundancia isotópica de los radionucleidos presentes en las moléculas. Una molécula de tiroxina contiene cuatro átomos de yodo y por ende la radiactividad específica de la tiroxina marcada con radioyodo depende no sólo de la clase de yodos radiactivos utilizados



para marcar, sino también de cómo muchos de los yodos estables son reemplazados por el yodo radiactivo.

Propiedades de la radiación e interacción con la materia

Es importante entender las propiedades de la radiación y el mecanismo de la pérdida de energía de radiación cuando ésta atraviesa la materia, ya que la operación de todos los dispositivos de detección para cualquier tipo de radiación dependen de una o más propiedades particulares de la radiación que se mide y de las interacciones de la radiación con la materia. Además, la seguridad en la manipulación de sustancias radiactivas requiere el conocimiento de la naturaleza de la radiación y de su capacidad para penetrar la materia. Los efectos nocivos de la radiación sobre los tejidos dependen principalmente de la capacidad de la radiación para ionizar la materia y de la energía de la radiación incidente.

Las interacciones de la radiación con la materia producen la transferencia de energía de un núcleo radiactivo al material que le rodea. Esta transferencia se logra a través de procesos de excitación e ionización; por consiguiente la radiación emitida de radionucleidos es denominada frecuentemente *radiación ionizante*.

La excitación ocurre cuando los electrones orbitales son perturbados, modificando su disposición normal por absorción de energía de la absorción incidente. Se produce ionización cuando la energía absorbida es suficiente para causar la expulsión de un electrón de su órbita, creando un par iónico (un electrón libre y un átomo o molécula cargados positivamente). Esta capacidad ionizante de la radiación se expresa mejor por el número de pares iónicos producidos por unidad de longitud de la trayectoria de la partícula, es decir, la ionización específica. En la Tabla 9-3 se exponen las ionizaciones específicas relativas de diversas formas de radiación.

La declinación radiactiva produce una corriente de partículas alfa o beta, o radiación electromagnética. Las partículas pueden estar cargadas negativamente (β^-) o positivamente (α y β^+). La radiación electromagnética puede poseer una cantidad relativamente de energía (rayos X) o una gran cantidad grande de energía (rayos gama). Tales diferencias en la naturaleza de la radiación crean importantes diferencias en sus formas de interacción con la materia. En la Tabla 9-3 se enumeran varias propiedades de la radiación.

Radiación particulada.

Debido a su doble carga y su relativamente gran masa, las partículas alfa producen una fuerte ionización, provocando que pierdan su energía rápidamente en una distancia corta (alta ionización específica); ver Tabla 9-3). En consecuencia, las partículas alfa tienen una débil capacidad de penetración y pueden ser detenidas completamente por capas muy delgadas de materiales sólidos. Por esta razón estas partículas son menos peligrosas externamente. Sin embargo, si logran entrar al cuerpo, irradiarán los tejidos que las circundan, causando un serio peligro a la salud. Los nucleidos que contienen partículas alfa se usan con poca frecuencia en medicina.

Las partículas beta pueden estar cargadas positivamente o negativamente. No se sabe que exista diferencia entre la partícula del negatrón y el electrón excepto por su origen. Los positrones son antipartículas de electrones. Las partículas energéticas del negatrón y del positrón también pierden su energía mediante ionización de moléculas, pero, debido a su



menor masa y carga, su ionización específica no es tan alta como la de las partículas alfa (ver Tabla 9-3). Como se discutió anteriormente, la declinación beta siempre va acompañada por la liberación de un neutrino y la energía liberada en el proceso de declinación es compartida entre la partícula beta y el neutrino en forma de energía cinética. Así, las partículas beta tienen un rango continuo de energía que comprende desde cero hasta un máximo de E_{\max} , dependiendo de la distribución de la energía de declinación entre la partícula beta y el neutrino, y tienen una energía promedio que equivale aproximadamente a una tercera parte de E_{\max} . La E_{\max} es equivalente a la energía total disponible de la declinación nuclear y es característica para cada radionucleido. En la Figura 9-3 se muestra el espectro de energía de la partícula beta de ^{14}C .

Radiación electromagnética

La radiación electromagnética hallada en el campo de la medicina incluye radiación gama y radiación X. Con excepción de las posibles diferencias de energía, estos fotones son indiferenciables y participan en el mismo tipo de interacciones con la materia. Dado que los fotones no poseen masa ni carga y viajan a la velocidad de la luz, podrían viajar a través de la materia por una distancia considerable sin ninguna interacción y luego perder toda o gran parte de su energía en una sola interacción. Los fotones pueden interaccionar con la materia en varias formas diferentes, de acuerdo a sus energías y a las propiedades de la materia con la que interaccionan.

El *efecto fotoeléctrico* es particularmente importante para los fotones de baja energía ($< 0.5 \text{ MeV}$). El fotón interacciona directamente con uno de los electrones orbitales de la materia (interacción fotón-electrón) y toda la energía del fotón es transferida al electrón. Parte de la energía transferida se utiliza para superar la energía de unión del electrón y la energía restante es transportada por el electrón como energía cinética. El electrón expulsado (fotoelectrón) transfiere a su vez su energía cinética a muchos otros electrones en su camino. El efecto fotoeléctrico es especialmente pronunciado si el número atómico del material absorbente es alto.

El *efecto Compton* o *dispersión Compton*, ocurre principalmente con fotones de energía media (0.5 a 1 MeV). En este proceso, el choque entre un fotón y un electrón produce la transferencia de sólo una parte de la energía del fotón al electrón. El fotón dispersado con energía reducida emerge del sitio de interacción en una nueva dirección. El electrón expulsado (electrón Compton) y el fotón dispersado pierden más energía en interacciones subsecuentes.

Medición de la Radiación Nuclear

Las mediciones de radiactividad dependen de la capacidad de los radionucleidos para producir átomos excitados ionizados dentro del detector. Hay dos tipos de detectores de uso común: de ionización de gas y de centelleo. Este último es capaz de detectar neutrones y radiación gama y proporciona información del tipo y energía de la radiación, siendo actualmente el detector más comúnmente usado en medicina. La discusión siguiente está dedicada principalmente a los detectores de centelleo; otros detectores sólo se mencionan brevemente.

Detectores llenados con gas

El contador Geiger-Müller y la cámara de ionización son ejemplos de detectores de ionización de gas. En el contador Geiger-Müller la radiación es detectada por ionización producida dentro de un gas adecuado. Debido a que los iones producidos son acelerados mediante un voltaje relativamente alto aplicado entre los electrodos del detector, se produce una considerable ionización secundaria que conduce a un gran pulso de salida (multiplicación electrónica). La ventaja principal de este tipo de detector, comparado con las cámaras de ionización, es su capacidad para detectar bajos niveles de radiación. La cámara de ionización funciona en base a un principio similar. Sin embargo, debido al menor voltaje utilizado, en la cámara de ionización se produce multiplicación electrónica y la señal de salida es relativamente pequeña. Ambos detectores son ampliamente utilizados en los medidores de prueba para medir la exposición del personal y localizar un radionucleido derramado.

Detectores de centelleo

El conteo por centelleo se basa en el principio de que una partícula cargada (alfa o beta) que entra en el detector, o un electrón excitado en el detector luego de una excitación con un fotón que llega (rayo gama), va a disipar su energía dentro del centellador contenido en el detector mediante diversos procesos de interacción mencionados previamente. Parte de la energía absorbida por el centellador es emitida como fotones en la región visible o cercana al ultravioleta del espectro electromagnético. Los centelladores son sustancias capaces de convertir la energía cinética de una partícula cargada o un fotón incidente en destellos luminosos (centelleo). La luz emitida por el centellador es convertida en fotoelectrones en el fotocátodo de un fototubo. La multiplicación (amplificación) del número inicial de fotoelectrones mediante un tubo fotomultiplicador y amplificadores produce pulsos de corriente eléctrica cuantificables, cuyas alturas están relacionadas con la energía de radiación y su número con la actividad del radionucleido.

Detectores de centelleo de cristal

El centellador más comúnmente utilizado para detectar radiaciones gama es un simple cristal de yoduro de sodio que contiene pequeñas cantidades de talio (~ 1%) como activador. La Figura 9-4 es un diagrama de bloques de los detectores de centelleo de cristal de yoduro de sodio activados con talio más comunes. El cristal posee usualmente la forma de una cisterna, dentro de la cual se coloca la muestra. El cristal de yoduro de sodio es muy higroscópico. Está encapsulado en un contenedor de metal, como aluminio, para evitar que absorba la humedad atmosférica, excepto en una cara (generalmente la inferior), que está cubierta por un metal transparente, como la lucita (polimetacrilato de metilo), ópticamente acoplado con la cara transparente del tubo fotomultiplicador.

Un rayo gama emitido por la muestra colocada en el cristal es altamente penetrante y, por ende, puede atravesar el vidrio o la pared plástica del tubo de ensayo que contiene la muestra radiactiva y penetrar en el cristal. Cuando el rayo gama atraviesa el cristal produce excitación o ionización, emitiéndose fotones luminosos. Por cada electrón voltio de energía absorbida se producen aproximadamente de 20 a 30 fotones luminosos. Éstos pasan a través del cristal transparente y golpean el fotocátodo del tubo fotomultiplicador, provocando la liberación de electrones del cátodo. La energía requerida para liberar un fotoelectrón del

fotocátodo es aproximadamente de 300 a 2000 eV.

Además de la conversión de los fotones luminosos emitidos por el centellador en un pulso de electrones cuantificable, el fotomultiplicador también amplifica la minúscula cantidad de corriente producida en el fotocátodo a un nivel que puede ser manejado eficientemente en los circuitos electrónicos amplificadores convencionales. Como se ilustra en la Figura 9-4, hay una serie de placas de metal, llamadas *dínodos*, espaciadas a lo largo del tubo fotomultiplicador. La superficie del dínodo está recubierta por un material capaz de emitir electrones secundarios cuando es golpeado por un electrón acelerado. Cada dínodo es mantenido a un potencial mayor que el precedente. Los fotoelectrones iniciales son acelerados hacia el primer dínodo y lo golpean produciendo electrones secundarios, que son a su vez acelerados hacia el segundo dínodo. Por cada electrón que hace impacto, se liberan aproximadamente tres o cuatro electrones del dínodo. Este proceso se repite hasta lograr una amplificación de aproximadamente 10^8 .

La corriente producida en el tubo fotomultiplicador es amplificada y el pulso de voltaje resultante se adapta al conteo óptimo mediante conteos electrónicos convencionales, como el que se ilustra en la Figura 9-4. El preamplificador reduce la distorsión de la señal eléctrica producida por el tubo fotomultiplicador. La corriente producida por el preamplificador es luego amplificada por el amplificador obteniéndose un voltaje de hasta 10 V.

La función del analizador de la altura de pulsos es seleccionar los pulsos de acuerdo a su altura y permitir aquellos pulsos que caen dentro de un rango determinado (el fotopico) alcancen el comparador de velocidad para el conteo. Esto se logra por medio de *discriminadores*. Un discriminador bajo fija el límite inferior y un discriminador alto fija el límite superior del rango de energía que va a ser contado. El discriminador bajo excluye todos los pulsos de voltaje por debajo del límite inferior; el discriminador alto excluye los pulsos de voltaje por arriba del límite superior. El intervalo de energía representado por la diferencia entre los dos niveles de discriminación se denomina *anchura de ventana*. Solamente los pulsos con energía en la ventana del discriminador preestablecido pasan a través del circuito anticoincidente y son contados en virtud de que el circuito anticoincidente transmitirá un pulso que llegue a su entrada proveniente del discriminador bajo solamente si no existe un pulso que llegue del discriminador superior al mismo tiempo.

Es importante advertir que la magnitud (altura) del pulso de salida del tubo fotomultiplicador es proporcional a la intensidad de fotones luminosos producidos en el cristal por un rayo gama y por lo tanto a la energía de rayos gama depositada en el cristal, mientras que el número de pulsos de voltaje por unidad de tiempo está relacionado con la actividad de la muestra radiactiva que esta siendo analizada. Cada radionucleido tiene un espectro característico de energías (altura de pulso), como se indicó previamente.

A diferencia de las partículas beta que dan un espectro continuo de energía (ver Figura 9-3), los fotones producidos por decaimiento gama tienen un valor de energía discreto y específico (ver Tabla 9-2). Este valor específico de energía aparecería en el espectro de energía de rayos gama como una sola línea vertical en el nivel de energía correspondiente a la energía del rayo gama emitido si el detector de centelleo de cristal utilizado fuese perfecto. En realidad, sucede que la intensidad de luz producida en el cristal y transmitida al fotocátodo, así como el número de electrones colectados en el ánodo para cada interacción de absorción total en el detector de cristal son ligeramente diferentes. Estas diferencias producen una curva con forma de campana (fotopico) en vez de una sola línea vertical. (Figura 9-5).



Todos los nucleidos que emiten rayos gama tienen sus propios fotopicos característicos en sus espectros de energía, que son muy útiles para la identificación de dichos radionucleidos. La Figura 9-5 muestra un espectro de energía de ^{125}I . Como se discutió anteriormente, el nucleido ^{125}I se descompone en ^{125}Te por captura de electrones con la emisión de rayos gama de 35 keV del nucleido hijo del ^{125}Te en el estado excitado y rayos x de 27 y 31 keV. El fotopico de aproximadamente 28.5 keV se atribuye a la detección de un solo fotón de los dos rayos x y los rayos gama de 35 keV, mientras que el fotopico de aproximadamente 56.8 keV se atribuye a la suma coincidente de los dos rayos x o un rayo x y el rayo gama de 35 keV. El fotopico de 56.8 keV es denominado fotopico coincidente y es el resultado de la emisión de un par de fotones coincidentes durante el proceso de decaimiento de ^{125}I (esto es, la emisión de dos fotones dentro del tiempo de resolución del detector). Ambos fotones del par son detectados por un detector de cristal de yoduro de sodio de alta eficiencia y son registrados como un sólo evento con una altura de pulso equivalente a la suma de las energías de los dos fotones. Este espectro único de energía se utiliza para determinar la eficiencia de conteo para ^{125}I en algunos analizadores de centelleo sólido sin el uso de un estándar de velocidad de desintegración conocida.

Se puede utilizar un detector de centelleo equipado con dos o más analizadores de altura de pulso (analizadores multicanal), a fin de contar simultáneamente dos o más radionucleidos, ya sea en la misma muestra o en muestras diferentes, siempre y cuando exista suficiente diferencia de energía entre ellas para que una parte de la energía del radionucleido pueda ser detectada separadamente del segundo radionucleido. Por ejemplo, el principal fotopico del ^{125}I se produce a 27 keV y el de ^{131}I a 364 keV. Además del fotopico de 364 keV, hay un fotopico menor de ^{131}I a 32 keV. A fin de contar una mezcla de estos dos isótopos, se centra un canal analizador (A) a 27 keV y el otro canal (B) a 364 keV, con una anchura de ventana de aproximadamente 20 a 40 keV. El canal B da la cuenta real para el ^{131}I , ya que el ^{125}I no aporta cuentas al canal B. Sin embargo, las cuentas del canal A representan la suma de las cuentas reales para el ^{125}I y el ^{131}I superpuesto. Se puede estimar el grado de superposición de ^{131}I contando el estándar de ^{131}I puro en ambos canales.

En los laboratorios clínicos que realizan técnicas radioinmunológicas, los contadores de centelleo de cristal equipados con detectores múltiples se usan frecuentemente, porque estos análisis incluyen la determinación de un gran número de muestras radiactivas. Con el uso de un instrumento multidetector, el tiempo total de conteo puede reducirse considerablemente. Sin embargo, es absolutamente necesario asegurarse de que todos los detectores en dichos contadores tengan un desempeño equivalente.

Detectores de centelleo líquido

Los detectores de centelleo líquido se utilizan principalmente para el conteo de radionucleidos emisores de partículas beta, como ^3H , ^{14}C y ^{32}P . A diferencia de lo que sucede con los fotones gama, la penetración de los negatrones es tan corta que no pueden atravesar la pared del recipiente de la muestra para interactuar con los centelladores de cristal. En conteo de centelleo líquido la muestra se disuelve o suspende en una solución o "coctel", que consta principalmente de un solvente como el tolueno, un centellador primario como el 2, 5-feniloxazol (PPO) y un centellador secundario como el 1, 4-bis-2(5-feniloxazolil)-benceno (POPOP). Las partículas beta de la muestra radiactiva disueltas en el coctel de centelleo



ionizan y excitan a las moléculas del solvente. La energía de excitación es transferida al centellador primario, que emite fotones luminosos cuando los electrones excitados retornan al nivel de energía basal. La longitud de onda emitida por el centellador primario es frecuentemente demasiado corta (~ 350 a 400 nm) para una detección eficiente por parte de los fotocátodos y los tubos fotomultiplicadores. El centellador secundario absorbe los fotones emitidos por el centellador primario y los vuelve a emitir a una longitud de onda mayor (~ 430 nm). Por ello, el centellador secundario se denomina también *desplazador de longitud de onda*. Sin embargo, los modernos tubos fotomultiplicadores son sensibles a la longitud de onda del centellador primario. Los centelladores secundarios se usan principalmente para una transmisión más eficiente de la energía proveniente de la partícula beta a fin de producir destellos luminosos, especialmente cuando una cantidad grande de muestra “atenuada” por el color se coloca en la solución de centelladores. Los problemas relacionados con la “atenuación” se tratan posteriormente en este capítulo.

Los principios operativos de los analizadores de centelleo de cristal sólido y los analizadores de centelleo líquido son básicamente los mismos salvo por la diferencia en la detección del centelleo. En la Figura 9-7 se muestra una disposición típica de los principales componentes de un contador de centelleo líquido. Los fotones luminosos producidos en la botella de la muestra son detectados y amplificados por los tubos fotomultiplicadores de la misma manera que en el contador de centelleo de cristal. En el detector de centelleo líquido, sin embargo, se incorporan un segundo tubo fotomultiplicador, un circuito coincidente y un circuito de recapitulación a fin de eliminar el ruido electrónico asociado con el tubo fotomultiplicador y mejorar la eficiencia de conteo para emisores de partículas beta de baja energía.

Los pulsos de ruido son eventos aleatorios y la probabilidad de que dos tubos fotomultiplicadores los produzcan simultáneamente es relativamente pequeña. En contraste, la partícula beta produce un estallido de fotones y dos tubos fotomultiplicadores recibirán fotones casi simultáneamente. Los pulsos producidos por cada tubo fotomultiplicador son conducidos a un circuito coincidente a fin de verificar si el pulso proveniente de un tubo fotomultiplicador está acompañado por un pulso correspondiente del otro dentro del intervalo de tiempo permitido (denominado *tiempo de resolución de coincidencia*, que suele ser de aproximadamente 20×10^{-8} seg). Los pulsos que están dentro del tiempo de resolución producen una señal coincidente, que se envía directamente a la puerta de coincidencia. Muchos pulsos de ruido no satisfacen los requerimientos del tiempo de resolución y son excluidos. El circuito de recapitulación se incorpora para sumar todos los pulsos coincidentes a fin de obtener la altura del pulso real. Los pulsos coincidentes son amplificados, clasificados y contados en forma similar a la del contador de centelleo de cristal.

En conteo de centelleo líquido es posible que no se lleve a cabo una correcta transferencia de energía, a menos que la muestra esté en contacto con la solución de centelleo, dando una solución homogénea transparente e incolora. Algunas muestras radiactivas no son solubles en la solución de centelleo y puede ser necesario añadir una o más sustancias para obtener una mezcla homogénea de centelleo. Se emplean solubilizadores tales como el cloruro de metilbencetonio (Hyamina 10X) para facilitar la disolución de la muestra en la solución de centelleo, o agentes gelificantes como el estearato de aluminio a fin de mejorar la eficiencia de conteo estabilizando la solución de muestra en los centelladores líquidos. Muchos cocteles comerciales de centelleo líquido de medios no polares (tolueno o xileno) contienen algún tipo



de agente tensoactivo como los Tritones (éteres de polioxietileno y otros compuestos) para mantener las muestras acuosas en suspensión coloidal a fin de que puedan ser contadas con alta eficiencia. Los materiales radiactivos no volátiles son también contados en soportes sólidos, como discos de papel filtro o fibra de vidrio sumergidos en una solución de centelleo. La desventaja de este método de conteo es que la eficiencia de conteo es relativamente baja debido a la atenuación por las impurezas.

La atenuación es básicamente un proceso que causa la reducción de la producción de la salida total de fotones de la muestra. Las impurezas presentes en la muestra radiactiva pueden competir con los centelladores por la transferencia de energía, es decir, la energía se pierde en un proceso que no produce luz. Este fenómeno se denomina *atenuación* (o "quenching" en inglés). El agua en las muestras acuosas, o un medio de soporte como un disco de papel o un filtro pueden causar atenuación. Las sustancias coloreadas como la hemoglobina pueden absorber los protones luminosos producidos por el proceso de centelleo antes de poder ser detectados en los tubos fotomultiplicadores. En el conteo de centelleo líquido la atenuación se detecta y corrige por determinación de la eficiencia. La eficiencia de la medición se define como la relación entre las cuentas por minuto observadas, cpm y las unidades absolutas de desintegración por minuto, dpm; por lo tanto:

$$\text{Eficiencia} = \frac{\text{cpm}}{\text{dpm}}$$

Debido a que las características de la atenuación de cada muestra son diferentes, se debe determinar la eficiencia para cada muestra. Conociendo la velocidad de conteo (cpm) y la eficiencia de conteo, se puede calcular su radiactividad absoluta (dpm). Se han desarrollado varios métodos para la determinación de la eficiencia de conteo, pero sólo se discutirán los más frecuentemente usados.

Estandarización interna

Es uno de los métodos más antiguos y el más exacto para determinar la eficiencia cuando se realiza correctamente. En este método la muestra se cuenta antes y después de introducir un estándar calibrado del radionucleido de interés. La diferencia entre las velocidades de conteo antes y después de la adición del estándar, dividida entre la actividad calibrada del estándar adicionado en desintegraciones por unidad de tiempo, es llamada eficiencia de conteo. Las desventajas de este método son la tardanza en la manipulación de la muestra y la pérdida de la misma cuando se requiere contarla después de la adición del estándar.

Relación muestra-canales

El método de la relación muestra-canales está basado en un desplazamiento hacia abajo del espectro de altura de pulso del fotón como consecuencia de la disminución de dicha altura por atenuación de muchas declinaciones de energía (Figura 9-8). El grado de desplazamiento está relacionado con el grado de atenuación o eficiencia de conteo y se expresa mediante el cambio en la relación de las cuentas de la muestra obtenidas a partir de dos diferentes condiciones de ventanas de discriminación (canales). Como se observa en la Figura 9-8, un



canal se fija usualmente para medir todo el espectro isotópico (L_1 a L_3) y el segundo canal está restringido sólo a una parte del espectro (L_1 a L_2). En este método se determinan las relaciones L_1 a L_2 y L_1 a L_3 de una serie de estándares artificialmente atenuados de eficiencias conocidas y se representan gráficamente como una función de la eficiencia de conteo, con objeto de obtener una curva de atenuación. Este método no requiere la manipulación adicional de la muestra a diferencia del de estandarización interna y es adecuado para el manejo de un gran número de muestras por medio de un sistema automatizado. Este método, no obstante, puede dar grandes errores en muestras altamente atenuadas o con baja velocidad de conteo.

Estándares externos

A diferencia del método de estándares internos, la actividad conocida en el método ^{226}Ra , colocada en una posición fija adyacente al frasco de la muestra. La fuente externa de rayos gamma genera electrones a través del proceso de colisión Compton. Los electrones Compton transfieren energía a la solución, generando centelleo del mismo modo que las partículas beta en el medio de centelleo. El espectro de energía producido por los electrones Compton está asimismo afectado por la presencia de materiales que causan atenuación, como en un espectro de partículas beta característico. La muestra se cuenta dos veces, una en ausencia y la otra en presencia del estándar externo. Como en el método de la relación muestra-canales, se utiliza una serie de estándares atenuados de eficiencias conocidas para obtener una curva de correlación entre la eficiencia de conteo de la muestra y la velocidad de conteo del estándar externo. La eficiencia de conteo de una muestra se puede determinar a partir de la velocidad de conteo del estándar externo contado con la muestra y de la curva de correlación. El método del estándar externo se ha convertido en parte integral de todos los detectores modernos de centelleo líquido.

Otro problema que ocurre en el conteo de centelleo líquido es la *quimioluminiscencia* o producción de fotones luminosos por interacción del material de la muestra con el soluto o solubilizador añadido a la solución de centelleo. La quimioluminiscencia da origen a fotones aislados y puede ser excluida del circuito de coincidencia del contador de centelleo líquido. Sin embargo, cuando las reacciones de quimioluminiscencia son de suficiente intensidad, pueden generarse pulsos de coincidencia de partículas no beta que interfieren con el conteo de partículas beta. El efecto de quimioluminiscencia desaparece finalmente, pero puede llevar varias horas, especialmente a bajas temperaturas. La presencia de quimioluminiscencia puede monitorearse por conteo repetido de la muestra. Algunos instrumentos modernos son capaces de monitorear y corregir automáticamente los efectos quimioluminiscentes.

Como ocurre con el conteo de detectores de cristal, es posible también el conteo de isótopos mixtos con un contador de centelleo líquido con analizadores de canales múltiples. Un ejemplo común de conteo de doble marca involucra una mezcla de tritio con una declinación máxima de partículas beta de 18.6 keV y ^{14}C con una declinación máxima de partículas beta de 156 keV.

Estadística del conteo

Dado que la declinación radiactiva es un proceso esencialmente aleatorio, es improbable que las mediciones sucesivas de una muestra determinada den el mismo número de cuentas. Sin embargo, la declinación radiactiva obedece a una *distribución de Poisson*. La fórmula de densidad de distribución de Poisson puede aplicarse en el cálculo de la medición de



una determinada velocidad de conteo. Si se realiza una sola determinación de cuentas totales, N, la precisión de ésta en términos del coeficiente de variación, CV, puede estimarse de la manera siguiente:

$$CV = \frac{N}{N} \times 100$$

Por ejemplo, con una cuenta total de 100, CV = 10%; de 1000, CV = 3.2%; de 10,000, CV = 1%. Esta aproximación es aplicable sólo cuando el conteo de fondo es insignificante comparado con el conteo de la muestra. Cuando las cuentas de fondo son significativas se debe usar la fórmula para la desviación estándar de una diferencia:

$$CV = \frac{N + B}{S} \times 100$$

Donde B representa las cuentas de fondo y S las cuentas de la muestra (N - B). Así, una cuenta total de 100 en presencia de un conteo de fondo de 10 da lo siguiente:

$$CV = \frac{100 + 10}{100 - 10} \times 100 = 11.7\%$$

Se puede aumentar la la precisión prolongando el tiempo de conteo, pero un CV de 1% (o sea 10,000 cuentas) es satisfactorio para la mayoría de las aplicaciones.

Salud y Seguridad Referentes a la Radiación

Aunque la cantidad de radiactividad que se maneja en el laboratorio de química clínica es generalmente muy pequeña, es vital para cada trabajador de laboratorio que tiene contacto frecuente con sustancias radiactivas tener un conocimiento básico de la seguridad radiológica, debido a que los efectos biológicos de la exposición a largo plazo a muy bajas dosis de radiación ionizante son todavía desconocidos en gran parte y pueden resultar peligrosos para la salud.

Los radionucleidos que se usan comúnmente en el laboratorio clínico son los emisores de partículas beta, como ^{14}C y ^3H , o los emisores de rayos gama, como ^{125}I y ^{57}Co . Ambas formas de radiación producen sus efectos biológicos mediante la producción de ionización y excitación, cuando se ponen en contacto con los componentes moleculares de los tejidos. Sin embargo, la radiación beta es menos penetrante que la radiación de gama; por lo tanto los emisores de partículas beta se consideran más peligrosos que los emisores de rayos gama en términos de la radiación interna y menos peligrosos en términos de la radiación externa. Por consiguiente la inquietud principal por los emisores de partículas beta es prevenir la entrada de



los materiales radiactivos al cuerpo a través de la inhalación, ingestión, o absorción por la piel. Con los emisores de rayos gama son también importantes otros factores, como el blindaje, el tiempo de exposición, y la distancia de exposición cuando se considera la seguridad radiológica.

Monitoreo

El monitoreo regular del personal y de las áreas de trabajo es un procedimiento importante para la seguridad radiológica. Es necesario medir periódicamente las dosis de exposición a la radiación del personal para asegurar que las dosis de radiación recibidas estén por debajo de los límites recomendados. Las siguientes tres unidades básicas se usan para medir la exposición a la radiación y la dosis.

El roentgen (R) es una unidad de rayos x o rayos gama y mide la cantidad de ionización producida por la radiación de fotones en una muestra dada del aire. Un roentgen equivale a esa cantidad de radiación fotónica capaz de producir una unidad electrostática de cualquier signo en 0.001293 g de aire.

La dosis absorbida de radiación (rad) es una medida de deposición de energía local por unidad de masa del material irradiado por cualquier radiación ionizante. Un rad es igual a 100 ergios de la energía absorbida por gramo del material absorbente.

El roentgen equivalente-hombre (rem) es la dosis de radiación ionizante que causa la misma cantidad de lesión biológica al tejido humano que 1 rad de radiación beta, x, o gama. En el caso de la radiación alfa, la dosis en rems equivale a la dosis en rads multiplicada por 20 ya que solamente se necesitan 0.05 rad de radiación alfa para producir el mismo efecto biológico que 1 rad de radiación beta, x, o gama. La dosis máxima permisible recomendada para el cuerpo entero es 0.5 rem por año para el público general y 5 rem por año para los trabajadores que manejan radiaciones.

Las películas dosimétricas son probablemente la manera más comúnmente usada y eficaz, en función de los costos, para monitorear al personal. La película fotográfica se torna ópticamente más densa a medida que se expone a la radiación ionizante y por lo tanto puede usarse para vigilar la dosis de radiación recibida por la persona que la lleva puesta. Ya que la mayoría del personal de laboratorio clínico que trabaja con técnicas radioinmunológicas habitualmente manejan compuestos marcados con ^{125}I , es aconsejable vigilar la posible acumulación de yodo radiactivo en la glándula tiroides. Se debe procurar medir el contenido de yodo de la tiroides de cada trabajador al menos dos veces por año o después de cada experimento de radioyodinación. Es necesario mantener todos los registros de exposición a la radiación de todos los trabajadores que manejan los materiales radiactivos al menos durante 5 años. Cada laboratorio debe tener un detector de radiación portátil, como un medidor de inspección portátil de Geiger-Müller, para monitorear la radiactividad en un área en que se manejan habitualmente materiales radiactivos. El monitoreo de radiación beta requiere generalmente tomar las muestras del área de trabajo con hisopos y usar un contador de centelleo líquido para determinar la presencia de radiactividad.

Control de la contaminación



La exposición a la radiación interna se controla solo mediante la prevención de la entrada de los materiales radiactivos en el cuerpo. Esto requiere el cumplimiento estricto de las reglas generales para la seguridad radiológica. Las prohibiciones de fumar, comer, beber, aplicación de cosméticos, o almacenamiento de alimentos están decretadas en las áreas de trabajo. No se debe realizar el pipeteo de los materiales radiactivos con la boca. Todas las personas que trabajan en las áreas radiactivas deben usar la ropa protectora designada (una bata estándar de laboratorio es satisfactorio en un laboratorio clínico involucrado en técnicas radioinmunológicas) y guantes desechables. Esta ropa protectora debe quitarse cuando uno deja el laboratorio y no debe llevarse a casa para lavarse. Los materiales radiactivos deben rotularse adecuadamente, almacenarse, y usarse solo en áreas especialmente diseñadas. El trabajo que implica la posible generación de sustancias volátiles radiactivas, como la radioyodinación, debe realizarse en una campana de extracción. La superficie de trabajo debe ser cubierta por una capa del material absorbente desechable. Además de las técnicas apropiadas de operación, son esenciales el aseo y buen mantenimiento para prevenir y reducir al mínimo la propagación y acumulación de la contaminación.

Menos preocupante es la exposición a la radiación externa en los laboratorios que realizan técnicas radioinmunológicas, porque la cantidad de radiactividad manejada en cualquier tiempo dado es muy pequeña (menos de $1\mu\text{Ci}$) y porque la energía de radiación del radionúcleo emisor de rayos gamma que más se usa, ^{125}I , tiene energías débiles que varían de 27 a 35 keV. No obstante, es siempre una buena práctica para reducir al mínimo el tiempo que se pasa en una área de radiación, maximizar la distancia de la fuente de radiación y utilizar un blindaje entre la el empleado y la fuente de radiación, especialmente para aquellos involucrados en la radioyodinación.

Las personas contaminadas con materiales radiactivos deben descontaminarse rápidamente para prevenir la posible transferencia de radiactividad a los órganos internos mediante la absorción a través de la piel. Deben estar aseQUIbles en cada laboratorio instalaciones para la descontaminación, como una ducha y una estación para el lavado de los ojos. Los materiales absorbentes deben usarse para remover el material radiactivo derramado. El área contaminada luego debe fregarse con jabón y agua. Es una buena práctica cubrir el área contaminada de inmediato con un pedazo de papel para prevenir que la radiactividad alcance otras partes del laboratorio.

Eliminación de desechos

El nivel de radiactividad de los materiales de desecho radiactivos generado en los laboratorios clínicos que participan en las técnicas radioinmunológicas es generalmente muy bajo, pero tal material de desechos radiactivos debe eliminarse según las normas establecidas por la Comisión Reguladora Nuclear de los Estados Unidos. Algunos estados (convenios estatales con la Comisión) son aprobados por el esta Comisión para reglamentar el uso, la seguridad, y los desechos de material radiactivo en el estado, garantizando que estos reglamentos sean más estrictos que los reglamentos de la Comisión. Por consiguiente es importante conocer los reglamentos estatales sobre materiales radiactivos si el laboratorio está ubicado en un estado que tiene este tipo de convenio.



Bibliografía

Bernier DR, Christian PE, Langan JK, Wells LD: *Nuclear medicine technology and techniques*, ed 2, St. Louis, 1989, Mosby.

Heal AV: Safety and disposal changes that affect regulations in radioassay labs, *Lab World*, pp 50-53, Dec 1981.

L'Annunziata MF: Radionuclide tracers, New York, 1987, Academic Press.

Radiation Protection for Medical and Allied Health Personnel, Recommendations of the National Council on Radiation Protection and Measurements, NCRP report no 105, Oct 1989.

Tablas

Tabla 9-1. Factores de declinación para el ^{125}I .

Días	Días				
	0	4	8	12	16
0	--	0.955	0.912	0.871	0.831
20	0.794	0.758	0.724	0.691	0.660
40	0.630	0.602	0.574	0.548	0.524
60	0.500	0.477	0.456	0.435	0.416

Table 9-3.

Nucleído	Vida media	Radiación principal		Actividad específica*	
		Tipo	Energía(keV)	mCi/mđg	mCi/mđmol
3 H	12,3 anos	bđ-	18	9,7	29
14 C	5160 anos	bđ-	158	0,0044	0,062
12 P	14,3 días	bđ-	1700	285	9120
15 S	87,1 días	bđ-	167	42,8	1500
51 Cr	27,8 días	ECKđ	320	92	4690
59 Fe	45 días	bđ-/gđ	460/1099	49.1	2900
57 Co	270 días	ECKđ	gđ122	8,5	480
125 I	60 días	ECKđ	gđ35	17,3	2200



--	--	--	--	--	--

131 I 8,1 días b̢̢-/g̢̢ 807/364 123 16100

* Libre de transportador

K̢̢Captura electr̢̢nica

Tabla 9-3. Propiedades b̢̢sicas de la radiaci̢̢n.

Radiación	Carga	Rango de energía	Rango aproximado de penetración		Ionización específica relativa*
			Aire	Agua	
Partículas					
α	+2	3.9 MeV	2 - 8 cm	20 - 40 μm	2500
β ⁻	-1	0 - 3 MeV	0 - 10 m	0 -1 mm	100
β ⁺	+1	0 - 3 MeV	0 - 10 m	0 -1 mm	100
Electromagnética					
Rayos X	Ninguna	1 eV a 100 keV	1 mm a 10m	1 μm a 1 cm	10
Rayos gama	Ninguna	10 keV a 10 MeV	1 cm a 100 m	1mm a 10 cm	1
*Número de pares iónicos producidos por unidad de longitud recorrida relativa a la de los rayos gama					

Radiación	Carga	Intervalo	Intervalo aproximado de viaje por		Ionización
		de energía	Aire	Agua	especifica relativa*
Partículas					
α	+2	3-9 MeV	2-8 cm	20-40 mđm	2500
β ⁻	- 1	0-3 MeV	0-10 m	0-1 mm	100
β ⁺	+1	0-3 MeV	0-10 m	0-1 mm	100
Electromagnética					
Rayos X	Ninguna	1eV- 100 keV	1mm-10m	1mđm - 1 cm	10
Rayos γ	Ninguna	10keV- 10 meV	1 cm- 100m	1 mm- 10 cm	1

Figuras

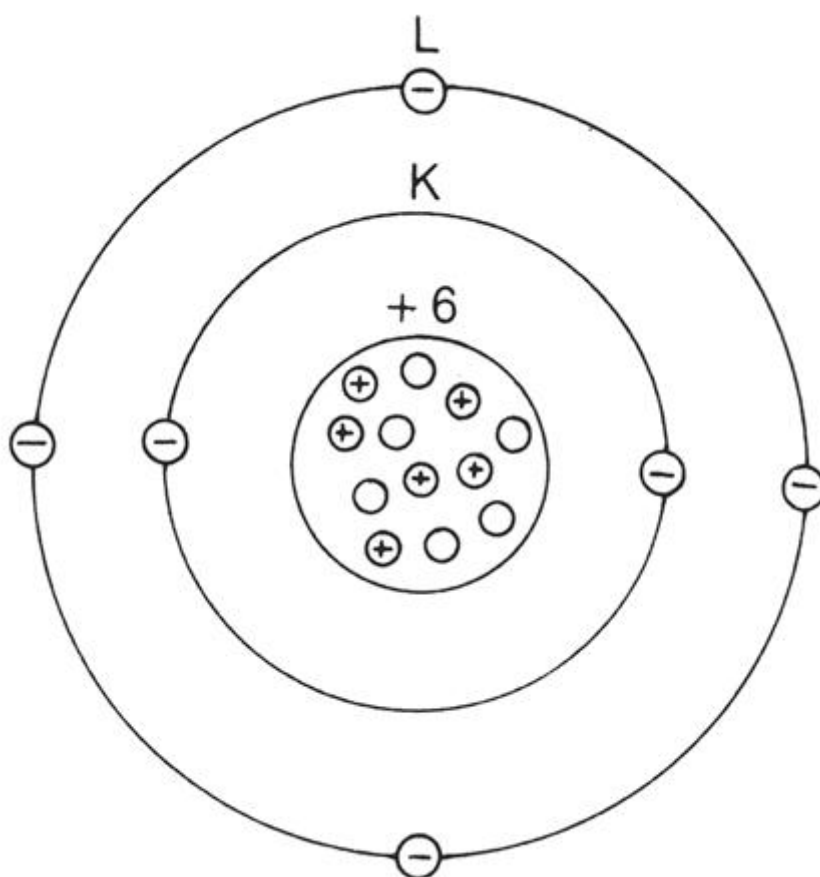


Figura 9-1

Modelo planetario del átomo de carbono.

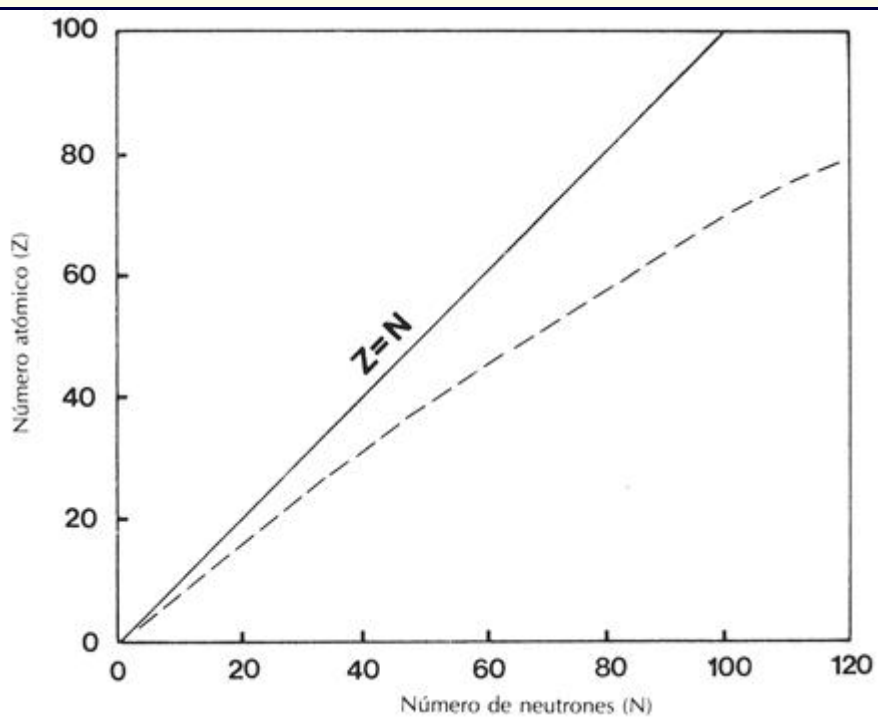


Figura 9-2 Relaciones protón-neutrón de isótopos estables, línea punteada.

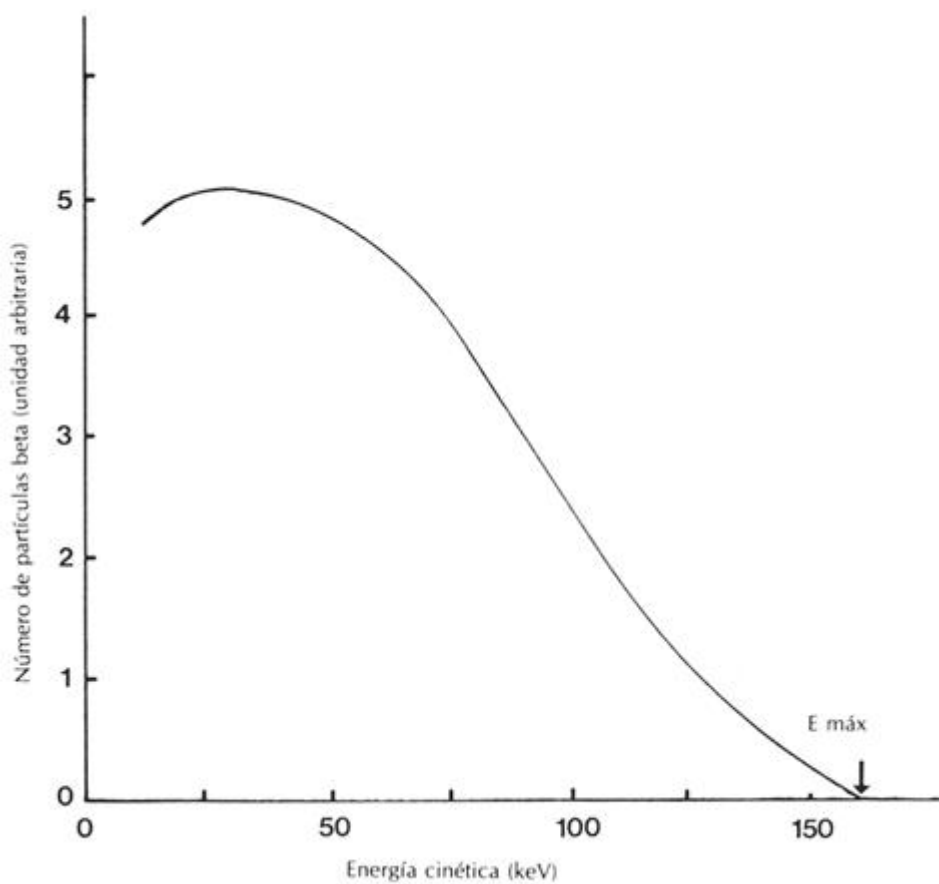


Figura 9-3 Espectro de partículas beta para el ^{14}C .

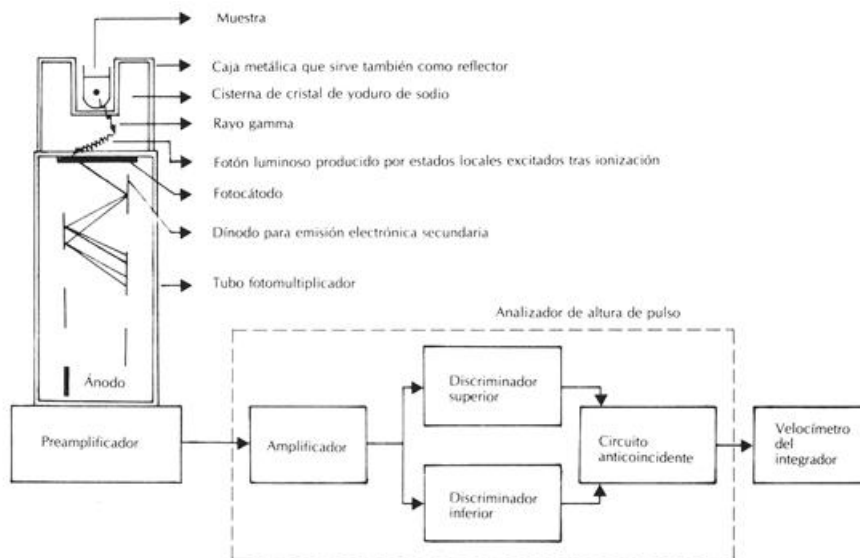


Figura 9-4 Diagrama que ilustra los principales componentes de un típico contador de centelleo de cristal

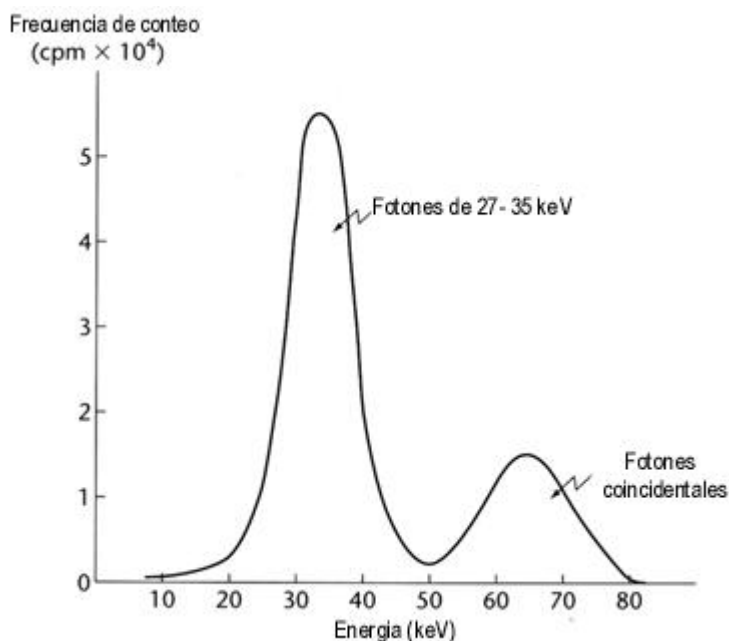


Figura 9-5 Espectro de ^{125}I que muestra el pico dominante de los fotones de rayos x (27 a 35 keV) y la energía aparente registrada en el detector en el evento en que dos fotones causan un centelleo simultáneamente (fotones coincidentes). (De: Thorell JJ, Larson

SM: Radioimmunoassay and related techniques: methodology and related applications, St. Louis, 1978, Mosby.)

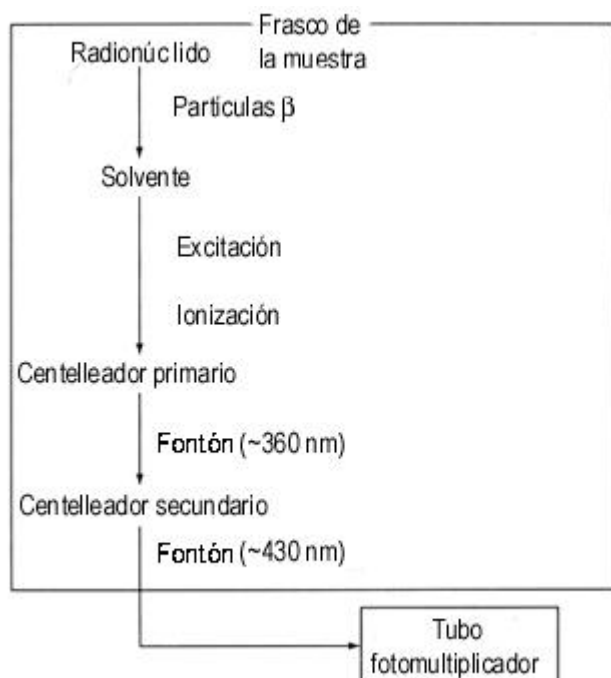


Figura 9-6 Proceso inicial de centelleo en un analizador de centelleo líquido. (De: Thorell JJ, Larson SM: Radioimmunoassay and related techniques: methodology and related applications, St. Louis, 1978, Mosby.)

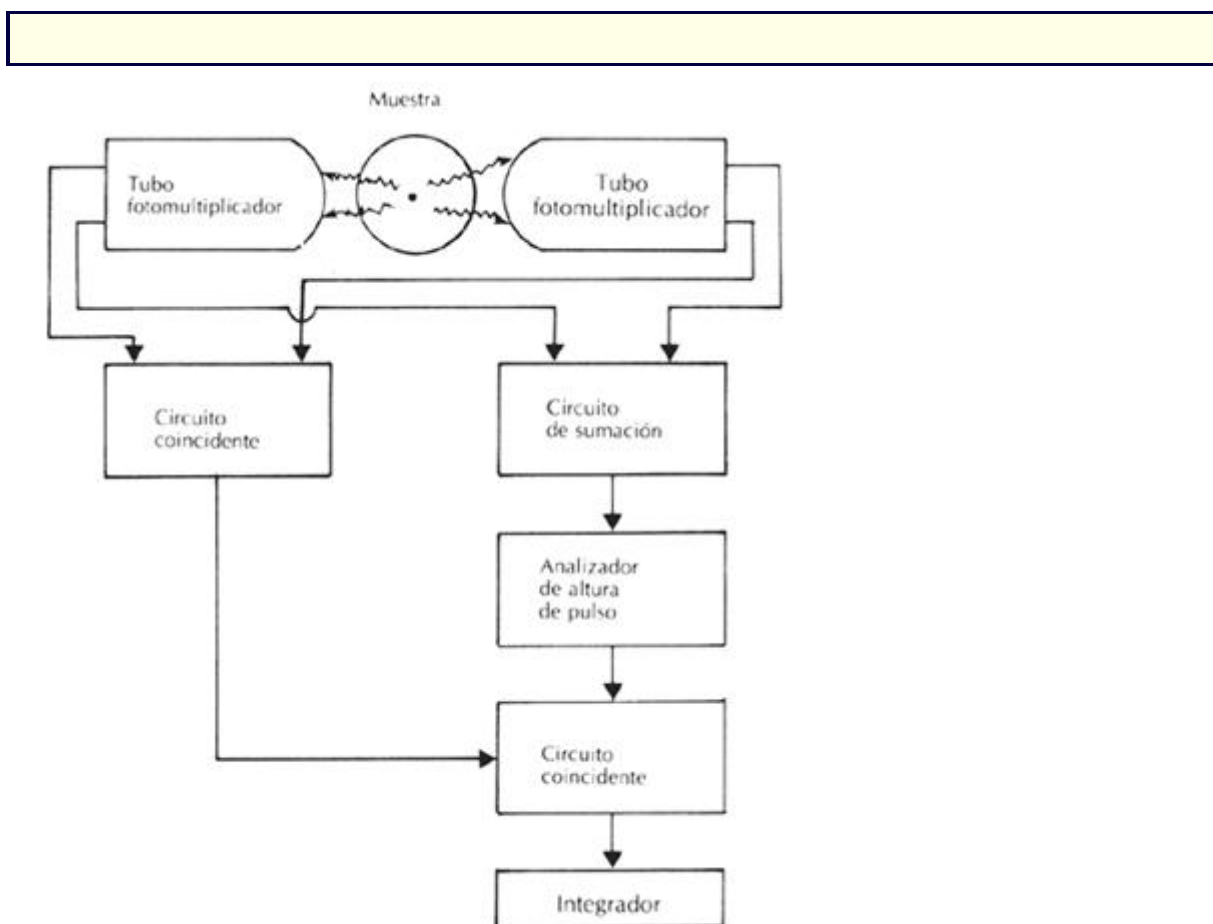


Figura 9-7 Esquema de un contador de centelleo líquido.

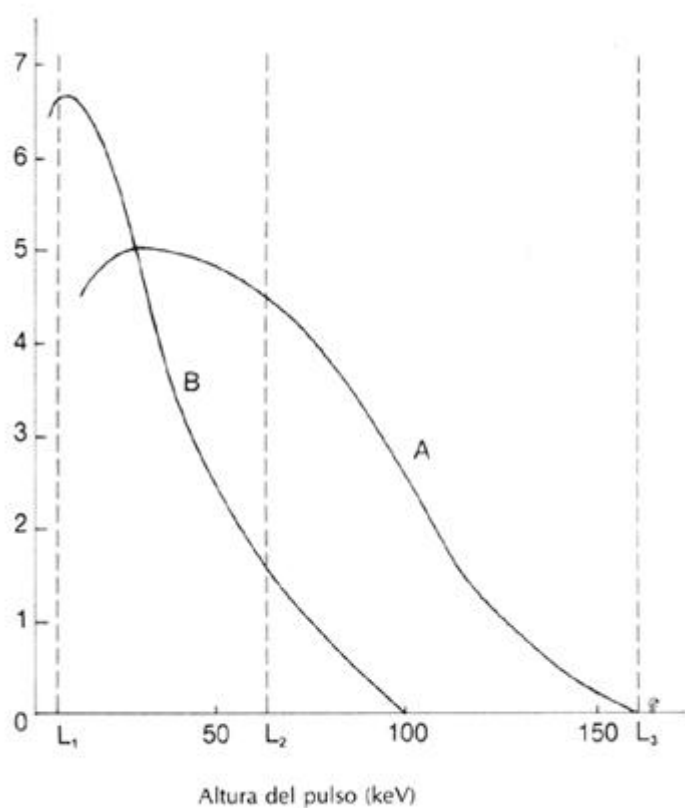


Figura 9-8 Espectro de altura de pulsos de ^{14}C sin atenuación, *A*, y con atenuación, *B*. El rango de L_1 a L_3 denota los niveles de discriminación

CAPÍTULO 10

10. Electroforesis

John M. Brewer

Aplicación de un campo eléctrico a una solución que contiene una partícula cargada

Fuerzas sobre una partícula

Movilidad de una partícula

Efecto del pH en la movilidad

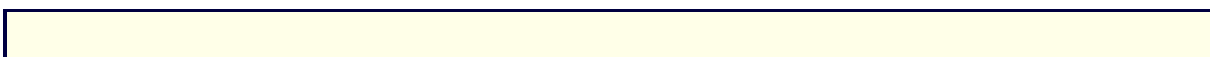
Electrolitos

Movimiento de iones y conductividad

Factores que afectan la movilidad de las macromoléculas

Carga y conformación

Atmósfera iónica y potencial zeta



Efecto de relajación

Efecto electroforético

Medios de soporte

Base funcional

Electroósmosis

Tipos de medios de soporte

Tamiz molecular

Técnicas de resolución aumentada

Amortiguadores discontinuos

Separaciones basadas en el tamaño molecular

Selección de métodos y condiciones

Medios de soporte

Condiciones

Localización del compuesto analizado

Tinción

Proteínas

Elección de la tinción

Otras técnicas de localización

Aplicaciones clínicas

OBJETIVOS

- Establecer las propiedades de carga de las sustancias anfotéricas a un pH ácido, isoelectrico, y básico.

Explicar la importancia de estas propiedades en la electroforesis.

- Describir el principio de la electroforesis y resumir cómo las separaciones electroforéticas de las moléculas son afectadas por los siguientes factores:

Técnicas de resolución aumentada

Tamaño molecular

Tamaño molecular y carga

Grosor del soporte

- Describir los problemas comúnmente hallados asociados con la electroforesis y explicar las causas probables y acciones correctivas.

- Enumerar tres medios de soporte comunes para la electroforesis y clasificar las tinciones de visualización comúnmente utilizadas, de acuerdo a la sustancia que se separa. Describir las reacciones físicas o químicas que permiten la utilización de una tinción para visualizar una sustancia específica.

- Describir el efecto o los efectos sobre la separación electroforética, de los siguientes parámetros:

Fuerza iónica del amortiguador

pH del amortiguador

Electroósmosis

Calentamiento

Términos Clave

anfolito Nombre comercial de una mezcla de sustancias con un rango de puntos isoelectricos que tienen altas capacidades amortiguadoras en sus puntos isoelectricos.

anfotérica Sustancia que puede tener una carga positiva, cero, o negativa dependiendo de las condiciones.

anión Partícula o ion con carga negativa.

amortiguador Mezcla de sustancias donantes y receptoras de protones, cuya función es mantener la concentración de protones (pH) constante o casi constante. Un ejemplo es la mezcla de ácido acético y acetato de sodio.

calentamiento joule Calentamiento de un conductor por el paso de una corriente eléctrica.

campo eléctrico Influencia medida en volts (o volts por centímetro) que se manifiesta por el comportamiento de una partícula cargada en una zona determinada.

neutralidad eléctrica Condición en la cual las cargas positivas totales son iguales a las cargas negativas totales.

cación Partícula o ion con carga positiva.

coeficiente de fricción Medida de la resistencia que ofrece una partícula al movimiento a través de un solvente.

co-ión Ion con la misma carga que el ion de interés; generalmente es un ion mucho más pequeño.

conductividad Capacidad de una sustancia de transportar la corriente. En una solución iónica, es la suma del producto de las concentraciones de la carga y la movilidad de la carga.

contraión Ion de carga opuesta al ion en cuestión; generalmente es un ion de menor tamaño.

convección Movimiento de masa de una parte de una solución relativo al resto, generalmente debido a diferencias en la densidad.

densitometría Medición de la absorbancia de los compuestos analizados a lo largo de un soporte.

duodecil sulfato de sodio (SDS) Detergente y desnaturalizante proteico particularmente eficaz.

electrotransferencia Técnica mediante la cual las sustancias separadas por electroforesis en un medio de soporte son transferidas a un material colocado contra el medio, empleando un campo eléctrico perpendicular al campo original de separación. El material sobre la lámina superpuesta adsorbe e inmoviliza las sustancias con el mismo patrón que el de la separación original. Esta técnica también se conoce como electroblot

electrodos Sustancias que están en contacto con un conductor. Las sustancias se conectan a la fuente de un campo eléctrico.

electroforesis Movimiento de partículas cargadas debido a un campo eléctrico externo.

electroforesis en disco Proceso de ordenamiento o isotacoforético seguido de una electroforesis de zona, generalmente en gel de poliacrilamida.

electrolito Sustancias iónicas, normalmente de bajo peso molecular, adicionadas para proveer un medio lo más constante y uniforme posible para la electroforesis.

electroósmosis Tendencia de una solución de moverse con respecto a una sustancia estacionaria adyacente cuando se aplica un campo eléctrico.

enfoque isoeléctrico Ordenamiento y concentración de sustancias de acuerdo a sus puntos isoeléctricos.

fuerza de resolución Capacidad de separar sustancias con migraciones muy cercanas entre sí.

fuerza iónica Suma de las concentraciones de todos los iones en una solución, determinado por el cuadrado de sus cargas.

gel Red de fibras que interactúan, o polímero sólido pero que contiene gran cantidad del solvente en poros o canales internos.



isoelectrico Condición caracterizada por una carga neta cero en una sustancia anfotérica.

isotacoforesis Ordenamiento y concentración de sustancias de movilidades intermedias efectivas entre un ion de movilidad efectiva alta y otro de movilidad efectiva mucho menor, seguido de sus migraciones a una velocidad uniforme.

movilidad efectiva Movilidad real de una sustancia bajo ciertas condiciones; generalmente es menor a la movilidad debido a una carga menor o a la resistencia del medio de soporte.

movilidad Velocidad de una partícula o ion lograda a un determinado voltaje aplicado.

Medida relativa de la rapidez con que se mueve un ion en un campo eléctrico.

ordenamiento Arreglo y concentración de macromoléculas de acuerdo a sus movilidades efectivas; por ejemplo, la isotacoforesis.

orilla Extremo de una zona, tal como una solución de macromoléculas próxima al solvente.

poliacrilamida Polímero de acrilamida y normalmente algunos derivados de enlaces transversales.

polielectrolito Sustancia con varios grupos cargados o potencialmente cargados.

potencial zeta Voltaje producido por la carga efectiva de una macromolécula, normalmente tomada en el límite entre las entidades químicas que se está moviendo con la macromolécula y el resto de la solución.

punto isoelectrico pH al cual una sustancia tiene carga neta igual a cero.

solvente discontinuo Solución que consiste, como mínimo, en dos regiones separadas que contienen diferentes iones.

tamiz molecular Separación de moléculas en base a sus tamaños efectivos.

transferencia Southern Una clase de electrotransferencia, en la cual las sustancias separadas y transferidas son ácidos nucleicos.

transferencia Western Una clase de electrotransferencia, en la cual las sustancias separadas y transferidas son proteínas.

zona Región particular o espacio dentro de una región más grande, generalmente diferenciada por alguna propiedad, como su residencia por una proteína.

El movimiento de partículas cargadas debido a un campo eléctrico externo se denomina *electroforesis*.^{ref(269)} Debido a que las moléculas cargadas pueden ser desplazadas, la separación de moléculas diferentes se puede lograr debido a las diferentes velocidades que adquieren en un campo eléctrico. Por lo tanto la electroforesis es una técnica de separación, tal como la cromatografía y la ultracentrifugación, existiendo similitudes entre estas técnicas.

El movimiento de una especie en una solución acuosa está afectado por la interacción de la especie con las moléculas del agua, esto es, la hidratación (Fig. 10-1). Cuanto más polar es la molécula, mayor es el agrupamiento de las moléculas de agua alrededor de la misma.^{ref(270)}

El campo eléctrico se aplica a una solución a través de *electrodos* con cargas opuestas colocados en la solución (Fig. 10-2). Un ion migra a través de la solución hacia el electrodo que posee carga opuesta. Por lo tanto, las partículas con carga positiva (cationes) se mueven hacia el electrodo cargado negativamente (cátodo), mientras que las partículas con carga negativa (aniones) migran hacia el electrodo cargado positivamente (ánodo).



Aplicación de un Campo Eléctrico a una Solución que Contiene una Partícula Cargada

Fuerzas sobre una partícula

La fuerza ejercida sobre una partícula cargada depende del campo eléctrico, V (en volts o volts por centímetro) y la carga sobre la partícula, Q . La fuerza sobre la partícula cargada es el producto:

$$F_{\text{elec}} = QV \quad \text{Ec. 10-1}$$

Cuando esta fuerza eléctrica, F_{elec} , se ejerce sobre la partícula, puede moverla. Sin embargo, una partícula que se mueve en un solvente tendrá una resistencia debido a la viscosidad del solvente. [refs\(271\)](#) La resistencia, que también es una fuerza, es proporcional a la velocidad: [ref\(272\)](#)

$$F_{\text{resistencia}} = f v \quad \text{Ec. 10-2}$$

Esta constante de proporcionalidad, f , se denomina *coeficiente de fricción*. El coeficiente de fricción depende de la viscosidad del solvente y del tamaño y forma de la partícula. A mayor viscosidad, menor es el movimiento. Cuanto mayor es la asimetría de la partícula, menor es su movimiento a través del solvente. El coeficiente de fricción de una partícula grande, como una proteína es una propiedad característica de la partícula.

Movilidad de una partícula

Cuando se aplica un campo eléctrico a una partícula cargada, la partícula comenzará a migrar. Las fuerzas electroforética y de fricción se oponen entre sí y la velocidad de la partícula aumenta hasta que las fuerzas se igualen ($F_{\text{resistencia}} = F_{\text{elec}}$). La velocidad, v , que alcanza una partícula en un campo eléctrico dado, V , se determina por dos propiedades de la partícula: su carga y su coeficiente de fricción. Consecuentemente el valor de v/V es también una propiedad característica de la partícula y tiene una importancia tal que posee su propia denominación. Se la denomina movilidad de la partícula.

Efecto del pH en la movilidad

Cada ion tiene una carga y movilidad particular. Sin embargo, cuando una solución contiene una sustancia cuyo pK es cercano al pH de la solución, dicha sustancia existe en forma cargada y no cargada en la solución. La fracción de subespecies con carga dependerá del pK de la sustancia y el pH de la solución. Cuando el pH es igual al pK_a de un ácido débil, solo el 50% de las partículas estarán cargadas. A una unidad de pH inferior al pK_a , el 90% carecerá de carga. A 1 unidad de pH superior al pK_a , el 90% de las entidades químicas en solución poseerá carga. Dado que la carga efectiva (promedio) de una sustancia varía con el pH , su *movilidad efectiva* también varía con el pH .

Esto es particularmente cierto para sustancias como las proteínas. Las proteínas son

claramente sustancias *anfotéricas*; es decir, ellas contienen grupos ácidos y básicos. Su carga neta depende del pH; será altamente positiva a valores bajos de pH, cero (isoelectrico) a pHs particularmente más altos y negativa a pHs aun más alcalinos. Dado que la movilidad es directamente proporcional a la magnitud de la carga, la movilidad efectiva de una proteína es en gran medida una función del pH.

La consecuencia práctica más importante de esto es que las soluciones electroforéticas deben contener un amortiguador para mantener un pH constante. El pH del *amortiguador* se selecciona para dar una carga neta óptima a fin de lograr la máxima separación. Para las proteínas, generalmente se usan valores de pH en el rango de 7 a 9. El amortiguador se utiliza para mantener este pH y por lo tanto la carga proteica neta a través del proceso electroforético. Los amortiguadores son sustancias iónicas por sí mismas y por lo tanto participan en cualquier proceso electroforético, hecho que también debe ser considerado.

Electrolitos

En la electroforesis, una sustancia tal como una proteína es colocada en una región limitada, o *zona*, del sistema y se la hace mover a otra región o zona. Por lo tanto, gran parte de la solución no contendrá proteínas en un momento dado. Si la proteína y sus contraiones asociados no están presentes para transportar la corriente en una región particular, otros iones deben estar presentes para ello. Por esta razón, es una práctica común adicionar un exceso, generalmente de un amortiguador de bajo peso molecular de aproximadamente 0.1M, a la solución a través de la cual la proteína debe migrar. El amortiguador y las sales iónicas (*electrolitos*) proveen un medio eléctrico constante, de tal forma que el movimiento general de la proteína sea lo más constante posible y la influencia por otras moléculas proteicas será mínima.

Movimiento iones y conductividad

En cualquier sistema eléctrico, la corriente producida es proporcional al voltaje aplicado:

$$V = \text{Resistencia} \times \text{Corriente} \quad \text{Ec. 10-3}$$

$$V = \frac{\text{Corriente}}{\text{Conductividad}} \quad \text{Ec 10-4}$$

En la electroforesis, la corriente es el flujo de iones (en ambas direcciones). La conductividad es la suma de las concentraciones multiplicada por las movilidades efectivas de todos los iones presentes. Un ion con una mayor movilidad efectiva transporta una fracción grande de la corriente. [ref\(273\)](#)

El voltaje, la conductividad y la corriente están por lo tanto relacionadas entre sí (ver ecuación 10-4). Si la conductividad aumenta por un incremento en la concentración de la sal mientras la corriente se mantiene constante, el voltaje debe disminuir. Tal disminución en el voltaje, reduce la fuerza eléctrica, F_{elec} , sobre las partículas cargadas, retardando el movimiento de las macromoléculas. Esto aumenta el tiempo necesario para una separación dada y la resolución disminuye debido a un aumento de la difusión. Si la conductividad



aumenta a un voltaje fijo, la corriente debe aumentar, aumentando de este modo el calor eléctrico (“calentamiento joule”) generado por el sistema, dado que el calentamiento es proporcional al cuadrado de la corriente. Un calentamiento excesivo produce alteraciones de convección en las soluciones, las cuales distorsionan los patrones electroforéticos y pueden también desnaturalizar las macromoléculas. Dado que el aumento de la conductividad a un voltaje o corriente fija tiene efectos indeseables, se debe mantener la concentración de los iones y por lo tanto la conductividad en valores moderados a fin de obtener resultados óptimos en una corrida electroforética.

Factores que Afectan la Movilidad de las Macromoléculas

Carga y conformación

El laboratorio clínico normalmente trabaja con polielectrolitos, que son sustancias que contienen varios grupos cargados o potencialmente cargados. La carga neta de un polielectrolito se determina por el número total de grupos cargados dentro del polielectrolito y su conformación. El plegamiento o *conformación* de una proteína da lugar a que se expongan sitios a cualquier molécula pequeña que pueda unirse. En algunos casos los iones de electrolitos se unen de manera firme y específica a la macromolécula. Por ejemplo, la albúmina del suero bovino puede unirse a varios iones cloro. Esto cambia la carga neta de la macromolécula y por ende su movilidad.

Atmósfera iónica y potencial zeta

Los contraiones, iones de carga opuesta, tienden naturalmente a rondar en la proximidad de los grupos cargados de las macromoléculas.^{ref(274)} Sin embargo, ellos realmente no neutralizan las cargas en la macromolécula, sino que se ubican a un rango de distancias de los grupos cargados de la macromolécula, formando una doble capa de carga alrededor de la misma, denominada *atmósfera iónica*.

La macromolécula se mueve con su entorno de hidratación y contraiones hidratados (Fig. 10-3). Esto reduce la carga efectiva de la macromolécula a un nivel dado por el *potencial zeta*. El potencial zeta es el voltaje producido por la carga efectiva de la macromolécula en la *superficie de la cáscara*. La superficie de la cáscara es el límite entre el complejo macromolecular entero en la solución (capa de hidratación y contraiones embebidos) y el material que queda atrás (el solvente).

Efecto de Relajación

Debido al movimiento térmico al azar, las macromoléculas sometidas a electroforesis se mueven irregularmente en saltos, en vez de hacerlo de una manera lineal continua. En cada salto, la atmósfera de contraiones queda de alguna manera relegada. Los contraiones (o sus sustitutos de otras porciones de la solución) se mueven luego para recuperar su posición anterior, pero esto toma un tiempo corto. Esto se conoce como *efecto de relajación*. Este efecto también tiende a disminuir la movilidad de la macromolécula, ya que los contraiones retrasados o que se encuentran momentáneamente fuera de su posición, producen un campo



que actúa en dirección opuesta al campo aplicado.

Efecto electroforético

Dado que los iones en una solución acuosa se hidratan, los contraiones del electrolito que se mueven en dirección opuesta acarrean el solvente con ellos. Por lo tanto, la macromolécula se mueve contra el *flujo* del solvente y su movilidad se reduce.

Medios de soporte

El objetivo de la electroforesis es separar una mezcla de sustancias, como las macromoléculas, en zonas completamente separadas. Cuanto más angosta o fina sea la zona original de una mezcla de macromoléculas, menor será la distancia de migración necesaria para lograr la separación. Utilizar una zona más angosta significa que la separación completa puede efectuarse en menos tiempo. También se reduce el aspecto borroso o la mezcla de las zonas separadas que puede ser causada por la difusión.

La mayor dificultad técnica al utilizar zonas angostas o finas de macromoléculas relativamente concentradas es el factor mecánico. Estas zonas serán considerablemente más densas que el solvente; por lo tanto las zonas pueden “caer” a lo largo del solvente de una manera más rápida que la requerida por las macromoléculas para realizar la electroforesis. A esto se denomina *flujo de masa o convección*. La solución convencional a este problema es el uso de un medio de soporte.

Bases funcionales

El medio de soporte debe permitir una penetración lo más libre posible del material a ser separado y obstaculizar la convección. La mayoría de los medios realizan esto al proporcionar un tamaño de poro restringido para el movimiento electroforético de las macromoléculas. Un tubo capilar tiene el mismo efecto. Esta es la base de la “electroforesis capilar de zona”. Los tubos capilares son pequeños, miden de 25 a 50 mm (0.025 - 0.05 mm) en sentido transversal.

Electroósmosis

El medio de soporte no debe interactuar con las moléculas, debido a que ello inhibirá o detendrá la migración. El problema de interacción comúnmente encontrado no es la adsorción del material. Son más comunes los efectos de los grupos cargados unidos al medio, lo cual resulta en la *electroósmosis*. Por ejemplo, el agar, que se usa con frecuencia como medio de soporte en la electroforesis, es una mezcla de agarosa y agarpectina. Esta última tiene un número relativamente grande de grupos carboxilos, los cuales tienen contraiones a un pH neutro. Al aplicar un voltaje, los contraiones se moverán, no así los grupos carboxilos unidos a la matriz de polisacáridos. Los contraiones transportan consigo suficiente solvente para producir un flujo *neto* de solvente en *una* dirección. Esto constituye el efecto de electroósmosis, algunas veces llamada *endósmosis*. Sin embargo, la electroósmosis es un efecto muy general.[ref\(275\)](#) Es más acentuada cuando grupos cargados están presentes en el medio de soporte, pero siempre sucede en alguna medida.

La electroósmosis en tubos de vidrio capilares ocurre en tal magnitud que los capilares



de vidrio utilizados en la electroforesis capilar de zona, a menudo se recubren con celulosa o plástico para reducir el efecto, el cual podría distorsionar seriamente el patrón de separación.

Tipos de medios de soporte

El medio de soporte puede ser una solución, como un gradiente de densidad de sacarosa, pero en general se utilizan materiales insolubles. Algunos son de soporte propio, mientras que otros son mecánicamente sostenidos por el aparato. El papel o las láminas de plástico, como el acetato de celulosa, tienen suficiente solidez mecánica para permitir la electroforesis en láminas suspendidas o extendidas sobre varillas.

Los medios de soporte también pueden clasificarse como particulados o continuos. Los medios de soporte particulados incluyen esferas de vidrio, Sephadex y fibras de celulosa. Los medios de soporte continuos incluyen la poliacrilamida, almidón, y geles de agarosa.

Los geles son sólidos parecidos a la gelatina y contienen una considerable cantidad de solvente. Los geles de almidón por ejemplo, están hechos de suspensiones de almidón que son calentadas y enfriadas. Las fibras de almidón interactúan, se enredan entre sí, pero atrapan el solvente de tal modo que existe una gran cantidad de huecos o poros entre las fibras. Estos huecos o poros constituyen las vías para el movimiento macromolecular. Pueden prepararse geles similares de agar, agarosa y algunos polímeros químicos. Los geles también pueden prepararse por polimerización de la acrilamida con un pequeño porcentaje de un derivado de acrilamida bifuncional que sirve para formar enlaces transversales con los polímeros de acrilamida (Fig. 10-4).

Tamiz molecular

La porosidad o el tamaño promedio de los poros de algunos medios es fija, pero la porosidad de otros medios puede ser controlada. Por ejemplo, cambiando las concentraciones del gel de almidón o el agar, puede variarse el tamaño del poro. Si el tamaño promedio del poro es cercano al diámetro promedio de las macromoléculas que serán puestas para la electroforesis, el medio de soporte producirá efectos de tamiz molecular.

El secuenciamiento del DNA se realiza por electroforesis de una mezcla de DNAs marcados con radiactividad, cuya longitud varía desde unos pocos nucleótidos hasta varios cientos de nucleótidos. Estos se separan por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 6% conteniendo urea 8M y de un modo tan eficiente, que las zonas adyacentes de los polinucleótidos separados difieren en longitud por un solo nucleótido. Pueden separarse (y “leerse”) hasta varios cientos de bases de longitud en un gel. Nótese que los oligonucleótidos en general tienen una carga negativa por nucleótido a valores de pH neutros, en otras palabras, una “relación carga-masa” constante, y generalmente tienen la misma forma y por lo tanto se separan exclusivamente sobre la base de sus pesos moleculares.

El tamaño promedio del poro de los geles de poliacrilamida a concentraciones de 5% a 10% es también comparable a los diámetros efectivos de varias proteínas globulares (relativamente compactas) de 15,000 a 250,000 daltones. Estos geles filtrarán tales soluciones, separando las proteínas en base tanto al tamaño como a la movilidad (ver Capítulo 5, referencia 6 y Capítulo 6, referencia 4). Los efectos de tamiz molecular pueden producir un aumento de la resolución, lo cual significa zonas más estrechas de macromoléculas.



Técnicas de Resolución Aumentada

Amortiguadores discontinuos

Varias técnicas electroforéticas emplean un sistema en el cual se colocan diferentes cationes o aniones del amortiguador a lo largo recorrido electroforético en cualquier lado de la zona de proteínas. Las movilidades difieren para cada ion. Si las especies iónicas colocadas antes y las especies colocadas después de una mezcla de sustancias de alto peso molecular, por ejemplo proteínas, tienen una movilidad adecuada, las proteínas se *acumulan* entre los dos iones. Si una serie de proteínas se somete a electroforesis en este sistema amortiguador discontinuo, ellas se ordenarán por sí mismas de acuerdo a sus movilidades efectivas y se concentrarán, resultando en una mayor resolución.

Existen tres aplicaciones principales del uso de sistemas discontinuos para producir un aumento de la resolución: isotacoforesis, enfoque isoeléctrico y electroforesis en disco. Estas técnicas, descritas brevemente en la Tabla 10-1, se utilizan con frecuencia para el análisis de proteínas.

Separaciones basadas en el tamaño molecular

Si la separación se realiza sobre la base del tamaño y la carga molecular, como se describe brevemente en la Tabla 10-2, se obtiene un aumento en la capacidad de separación. Estas técnicas normalmente emplean poliacrilamida o agarosa para preparar geles con poros de tamaño conocido. Las moléculas de menor tamaño molecular migrarán más rápido en la electroforesis que las moléculas más grandes que poseen cargas similares.

La electroforesis de estas sustancias se utiliza algunas veces con fines analíticos para estimar los pesos moleculares de acuerdo a la distancia de migración de la sustancia, comparado con la distancia de migración de sustancias con pesos moleculares conocidos (estándares), bajo las mismas condiciones.

Selección de Métodos y Condiciones

El conocimiento del punto isoeléctrico y el peso molecular del compuesto que se analiza puede ayudar a determinar las condiciones óptimas para una separación electroforética. El amortiguador debe ser elegido con un pH tal que se logre la máxima separación sin destruir las propiedades de la muestra. Las condiciones muy ácidas o alcalinas plantean problemas en cualquier sistema, debido a que una gran fracción de la corriente es transportada por los iones protones o hidroxilos, resultando en una separación más pobre. Un resumen de los efectos de los diversos parámetros en la electroforesis se muestra en la Tabla 10-3.

Medios de soporte

La elección de un medio de soporte está basada en varias consideraciones. Las películas o placas resultan útiles cuando se comparan diferentes muestras, y la electroforesis clínica de rutina se realiza utilizando soportes de forma rectangular. Los cilindros de gel se

utilizan algunas veces en el enfoque isoelectrico. El empleo de los cilindros de gel puede proporcionar gran sensibilidad, aunque los métodos de capa fina proveen una sensibilidad aun mayor.

Papel y acetato de celulosa.

El papel es especialmente popular para la separación de las sustancias de bajo peso molecular en los laboratorios bioquímicos especializados. Las principales ventajas de estos materiales son su fineza y solidez mecánica. Un medio más fino significa una mayor sensibilidad debido a que se necesita menos material para producir una mancha o zona detectable. En un soporte más grueso, la misma cantidad de muestra en una zona se distribuye en un volumen mayor, por lo tanto estará más diluido y será más difícil de detectar. Por otra parte, debe aplicarse una mayor cantidad de muestra a un soporte más grueso para detectar con igual facilidad. El uso de soportes de menor espesor implica menos muestra y por consiguiente una menor cantidad de material se separa electroforéticamente. Esto constituye una ventaja si se dispone de poca muestra, aunque generalmente ésta no es la situación en los laboratorios clínicos.

El acetato de celulosa se prepara tratando la celulosa con anhídrido acético. Esto adiciona los grupos acetilos en los grupos hidroxilos del azúcar. El material resultante se comprime en placas que son algo más fuertes que el papel y mucho más uniformes desde el punto de vista químico. La adsorción del material a los grupos químicos en el papel da lugar a la pérdida del material y al *coleo* de zonas. El acetato de celulosa es más inerte en este sentido y debido a su uniformidad y facilidad de preparación (las tiras están empapadas con el amortiguador electroforético, de modo que evita que el aire quede atrapado), su uso está muy difundido en el trabajo clínico de rutina.

Geles.

El desempeño de los geles puede ser regulado variando el grosor para aumentar o disminuir la capacidad (la cantidad de muestra). Los geles también ofrecen la posibilidad de un efecto de tamiz molecular debido a que su porosidad puede ser controlada cambiando su composición. Por otro lado, su solidez mecánica tiende a ser baja.

Almidón y agar.

Los geles de almidón no son muy utilizados como la agarosa, acrilamida, o Sephadex. La solución de almidón debe calentarse a 100°C, luego degasificarse, proceso delicado, y luego se solidifica. Los geles de almidón tienden a proporcionar mayor resolución que la del agar o agarosa. Sin embargo, la inconveniencia de preparar geles de almidón limita su uso.

El agar y la agarosa (agar sin agarpectina) son más fáciles de manipular. Debido a que la agarosa experimenta un menor efecto electroosmótico y presenta menos problemas con la adsorción, es más preferible que el agar. El tamaño del poro de la agarosa es mayor que el de la poliácridamida. Ésta es la razón por la cual el agar o la agarosa se utilizan en la mayoría de las técnicas de inmunoelectroforesis, ya que el antígeno y el anticuerpo deben ser capaces de migrar a través del gel. Otra ventaja de la agarosa es que ésta puede vertirse luego del recalentamiento a una temperatura cercana a los 50° C; por lo tanto algunas proteínas, como los anticuerpos se pueden mezclar sin que se desnaturalicen. No obstante, las mismas desventajas halladas en la preparación de los geles de almidón se encuentran cuando se

preparan los geles de agar y agarosa. Se disponen comercialmente geles de agarosa presolidificados para una variedad de separaciones. Estos geles se usan para la separación de isoenzimas, hemoglobinas, glicoproteínas y otros.

Poliacrilamida.

Los geles de poliacrilamida se usan con menor frecuencia en los laboratorios clínicos pero son comunes como herramienta de investigación. Son transparentes, fáciles de preparar y muestran una solidez mecánica razonable sobre el rango de concentración de la acrilamida que normalmente se emplea para las proteínas. Además, muestran un bajo efecto de endósmosis y tienen un tamaño de poro adecuado para la separación del promedio de las proteínas, moléculas de ácido ribonucleico (RNA) y fragmentos de restricción más pequeños de DNA utilizado. El principal uso clínico de los geles de poliacrilamida es la separación de las isoenzimas de la fosfatasa alcalina. Sin embargo, la preparación y la solidificación del gel de poliacrilamida es una operación más exigente, consume mayor tiempo, y es difícil lograr una reproducibilidad en la preparación del gel. Actualmente se pueden adquirir placas de poliacrilamida de varias firmas.

Las placas de acetato de celulosa pueden conseguirse en lotes relativamente uniformes de tal forma que los resultados de los diferentes experimentos de electroforesis son más consistentes. Luego de la electroforesis, las tiras pueden cortarse en bandas que contienen materiales teñidos o radioactivos. Estos cortes pueden disolverse en un solvente como la acetona para una fácil cuantificación.

Por otro lado, la resolución con el acetato de celulosa no es tan buena como la que se logra con la poliacrilamida. Ocho o nueve fracciones de proteínas séricas pueden separarse empleando el acetato de celulosa, pero pueden detectarse hasta 30 fracciones usando la electroforesis en disco sobre geles de poliacrilamida.[ref\(276\)](#) Por lo tanto, el acetato de celulosa se utiliza porque permite determinaciones rápidas, fáciles y reproducibles a pesar de su resolución comparativamente baja.

Electrotransferencia.

Hay una excepción en cuanto al requerimiento de que un medio de soporte no interactúe con el material que se separa. En la técnica del *Western blot*[ref\(277\)](#) o electrotransferencia, la película de gel que contiene las proteínas separadas se somete a electroforesis perpendicularmente a la placa, con la transferencia de algunas o todas las proteínas separadas a una placa opuesta, que comúnmente es nitrocelulosa, la cual adsorbe las proteínas[ref\(278\)](#) (ver Fig. 10-4). Esta placa puede teñirse para detectar proteínas o actividad enzimática (ver el texto que sigue). Sin embargo generalmente, la placa se lava con alguna proteína neutra, como la proteína de la leche o la albúmina del suero bovino, para bloquear los sitios de adsorción que no están ocupados. De esta forma se determinan, generalmente por técnicas inmunoquímicas, la localización de las proteínas adsorbidas específicas que fueron transferidas. El patrón resultante puede compararse con la película del gel original, que es teñida o examinada por autoradiografía para todas las proteínas o todas las proteínas marcadas, respectivamente.

La principal virtud de las electrotransferencias Western es su sensibilidad (la adsorción *concentra* las proteínas). La adsorción de los antígenos o anticuerpos se realiza a concentraciones del antígeno y el anticuerpo que resultan ser muy bajas para la formación de



un precipitado. Pueden detectarse e identificarse cantidades tan bajas como 10^{-10} g de proteína.[ref\(279\)](#) Consecuentemente, pueden ser detectados y aun cuantificados los antígenos (y anticuerpos) en el suero que están presentes en concentraciones muy bajas. Esta técnica se utiliza para la detección de los antígenos y anticuerpos del síndrome de inmunodeficiencia adquirida en los pacientes.[ref\(280\)](#)

Condiciones

Comparación entre las posiciones horizontal y vertical.

La electroforesis se puede realizar tanto horizontal como verticalmente; no existe una razón teórica que favorezca uno u otro procedimiento. En la electroforesis horizontal se ejerce menor fuerza mecánica sobre el soporte, mientras que en la electroforesis vertical los medios de soporte se colocan con frecuencia entre placas de vidrio.

Si se emplea la electroforesis horizontal y la superficie del medio está expuesta al aire, la evaporación del solvente puede causar problemas. Como resultado de la evaporación, aumenta la concentración de la sal, generalmente de modo no uniforme a lo largo del soporte, causando un flujo de corriente y calentamiento no uniformes. Esto puede generar problemas de migración irregular, especialmente a los lados del lecho horizontal y plano de la electroforesis. La electroforesis “submarina” es una electroforesis horizontal en la cual el soporte se cubre con la solución del amortiguador de tal manera que no ocurre evaporación desde el soporte. La muestra se inserta dentro de ranuras u orificios en el soporte y se somete a electroforesis a través del mismo. Si un reservorio del amortiguador está más alto que el otro, puede generarse un flujo de convección del amortiguador a través del medio de soporte. Por lo tanto el aparato de electroforesis debe estar siempre nivelado.

Aplicación de la muestra.

Algunas veces las muestras se aplican simplemente en la superficie del medio de soporte y se dejan absorber. Otras veces se preparan o se hacen ranuras u orificios especiales en el gel. Ocasionalmente la muestra puede ser polimerizada dentro del gel o solidificada en él. Raramente se inyecta la muestra, excepto en la isotacoforesis. En la electroforesis capilar de zona, una cantidad muy pequeña de muestra (unos pocos microlitros) se somete a electroforesis en el tubo capilar. Los aplicadores de muestra comerciales pueden aplicar simultáneamente el número deseado de muestras de 1 o 2 mL, por ejemplo suero, en la superficie del soporte; tal dispositivo ayuda a obtener mayor uniformidad en las formas y tamaños iniciales de las zonas de las muestras, mejorando la reproducibilidad de los resultados en los laboratorios clínicos. Si la electroforesis se realiza en fases (como en la electroforesis bidimensional), el gel que contiene parte o toda la muestra puede cortarse y pegarse de nuevo, algunas veces usando agarosa como “adhesivo”, a otro gel para la siguiente fase de la separación. A menudo la muestra se coloca en la superficie de un gel. Se logra que la muestra tenga mayor densidad que el solvente, mediante la adición de sacarosa o glicerol. Todas las técnicas mencionadas son igualmente válidas cuando se combina con el tipo apropiado de ensayo.

Consideraciones relativas a la corriente y el voltaje.

La electroforesis puede realizarse a un voltaje constante, corriente constante, o potencia constante. La elección de cualquiera de estas modalidades depende de la fuente de poder disponible. Dado que la difusión aumenta con la raíz cuadrada del tiempo, lo mejor es completar la electroforesis tan pronto como sea posible. Esto requiere el uso del voltaje máximo. Sin embargo, el voltaje máximo está siempre limitado por la eficiencia de enfriamiento del aparato. Algunos operadores manifiestan que los gradientes de temperatura de más de 0.1°C a través del gel u otro soporte, causan distorsiones notables en las zonas de las macromoléculas. Para algunas aplicaciones clínicas actuales, no parece ser necesario un control de la temperatura y las separaciones se realizan a temperatura ambiente.

En la actualidad está muy difundido el uso de soportes más delgados (o capilares) debido a que los gradientes de temperatura que se generan son más pequeños por la disipación de calor más eficiente que se alcanza en los soportes más delgados. Esto significa que pueden aplicarse mayores voltajes, produciendo separaciones más rápidas y consecuentemente menos difusión, y patrones de separación más claros y definidos. También pueden someterse una mayor cantidad de muestras a la electroforesis en un tiempo dado, lo cual constituye un aspecto importante en el trabajo de laboratorio de rutina. Los geles para secuenciación de DNA son de aproximadamente 1 mm de grosor. Estos soportes son muy frágiles y por lo tanto requieren un manejo muy cuidadoso. Los soportes de agarosa o poliacrilamida comerciales se colocan en láminas de plástico para permitir su uso en el trabajo de laboratorio de rutina.

Un sistema de electroforesis comercial recientemente desarrollado emplea un sistema de enfriamiento muy eficiente y geles de agarosa premoldeados muy finos, para realizar una electroforesis de alto voltaje. La electroforesis se completa en 2 a 3 minutos en lugar de 20 minutos, gracias a la utilización de un voltaje de 1000 a 2000 V en lugar de 100 V. Esto maximiza la eficiencia del sistema electroforético en términos de tiempo y resolución. La electroforesis capilar de zona emplea voltajes de 300 a 400 V/cm, lo cual resulta con frecuencia en un tiempo de electroforesis de menos de 10 minutos.

La conductividad de cualquier sistema electroforético cambiará con el tiempo debido a que la composición iónica se modificará como resultado del movimiento (electroforesis) de la muestra a través del sistema. Estos cambios son mínimos en los sistemas continuos, como la electroforesis en papel de alto voltaje, siendo satisfactoria la aplicación de un voltaje constante para estos sistemas. Para la isotacoforesis, se desea una velocidad constante de migración de las zonas y se utiliza una corriente constante. Para otros sistemas electroforéticos, el calentamiento es generalmente el factor limitante (ver discusión previa) y por lo tanto debe emplearse una potencia constante (wataje). La electroforesis en disco y el enfoque isoeléctrico caen dentro de esta categoría. Las fuentes de poder pulsantes no proveen ventajas.[ref\(281\)](#)

Tiempo de separación.

En el caso de la isotacoforesis, la electroforesis se detiene cuando emerge el ion que va detrás. El enfoque isoeléctrico se completa una vez formado el gradiente y luego de que la corriente llega a un valor estable. El tiempo de detención de una separación electroforética de disco o de zona convencional está generalmente indicado por la posición del colorante indicador, cuando la banda de este colorante alcanza una posición predeterminada en el soporte estacionario (típicamente el extremo terminal del soporte). Se utilizan los



colorantes que tienen altas movibilidades, tal como el azul de bromofenol. Estos colorantes generalmente se agregan a la muestra. Dado que algunas proteínas se unen a estos colorantes, sus movibilidades aparentes pueden ser alteradas.

Localización del Compuesto Analizado

El análisis electroforético involucra determinar en qué parte del soporte dónde están las sustancias a ser identificadas o cuantificadas. Esto puede lograrse midiendo una propiedad física de la molécula, como la absorción luminosa, o el índice de refracción, o utilizando una reacción química como la tinción. La medición de las propiedades físicas puede carecer de especificidad, sensibilidad, o resolución. Por ejemplo, no todas las proteínas tienen una fuerte absorción a 280 nm.

El empleo de longitudes de onda más cortas (por ejemplo a 200 nm), donde la mayoría de las sustancias tienen una absorción más fuerte, mejora la sensibilidad de las mediciones directas, a costa de posibles interferencias de otras sustancias absorbentes. Un aparato comercial de electroforesis capilar de zona utiliza un dispositivo óptico que realiza un microenfoco, para permitir mediciones directas de las sustancias separadas dentro del tubo capilar a medida que ellas migran a través del haz de luz. Un problema importante en la medición directa es que con los instrumentos actuales, los patrones de las sustancias separadas deben obtenerse uno por uno.

Tinción

La tinción con frecuencia logra los objetivos deseados de resolución, sensibilidad, especificidad, y velocidad (Tabla 10-4). Dado que las zonas del material se amplían por la difusión luego de que la electroforesis haya sido detenida, el primer paso en el procedimiento analítico es evitar la difusión. Esto puede realizarse en la electroforesis en papel mediante el secado o en la autoradiografía mediante el secado o congelamiento de los geles. En la electroforesis clínica de rutina, generalmente los soportes se secan en una estufa antes de la medición.

Proteínas

Las proteínas con frecuencia se desnaturalizan en los geles (es decir precipitan en la matriz del gel), sumergiendo los geles en ácido acético diluido o más efectivamente con ácido tricloroacético. La adición de ácido sulfosalicílico mejora aun más la capacidad desnaturalizante de la solución colorante. En el procedimiento de electrotransferencia, las proteínas son inmovilizadas por adsorción.

Algunas veces el calor también se debe aplicar para insolubilizar las proteínas. Sin embargo, algunas resisten la desnaturalización por todos estos procedimientos convencionales y permanecen solubles en el colorante. Si están presentes detergentes tal como el duodecil sulfato de sodio u otros agentes solubles, ellos interferirán con la precipitación. La inclusión de metanol en las soluciones ácidas ayuda a remover tales sustancias antes de la tinción.

Elección de la tinción

Se emplean varios tipos de tinción, dependiendo de las necesidades. Algunas veces se

desea teñir la totalidad de una clase de sustancias, por ejemplo todas las proteínas. Un colorante llamado "*Stains-All*" es el adecuado.[ref\(282\)](#) La *tinción de plata*, que reacciona tanto con las proteínas y los ácidos nucleicos,[ref\(283\)](#) es una alternativa. Las proteínas, luego de la electroforesis en acetato de celulosa, son teñidas con Ponceau S en la mayoría de los casos.[ref\(284\)](#)

Los colorantes y procedimientos de tinción son a menudo específicos para un grupo químico. Un ejemplo es el colorante ninhidrina (hidrato de tricetohidrinden) para grupos amino, que se utiliza frecuentemente luego de una electroforesis de péptidos o aminoácidos, en papel. Las glicoproteínas pueden tratarse con ácido peryódico (para la oxidación) y el color se desarrolla con un colorante (fucsina) en presencia de un agente reductor (sulfito). Esta tinción de Schiff-ácido peryódico oxida los grupos carbohidratos a aldehídos, los cuales reaccionan con el colorante para formar una base de Schiff. El sulfito reduce la base de Schiff, haciendo permanente la tinción. Hay también una tinción específica para las fosfoproteínas. Righetti y Drysdale[ref\(285\)](#) presentan una lista bastante completa de tinciones. (Ver lista de tinciones comúnmente usadas en la Tabla 10-4).

Una vez que el colorante ha sido incorporado, generalmente por inmersión del soporte dentro del colorante, debe eliminarse el exceso del mismo. Esto puede realizarse electroforéticamente o más comúnmente por difusión. La eliminación por electroforesis es rápida pero pueden producirse distorsiones de las zonas teñidas. La difusión involucra el cambio del solvente o el uso de un decolorante para eliminar el colorante libre.

Varias enzimas son identificadas con el uso de sustratos coloreados o fluorescentes, o productos (zimogramas), aun en los geles u otros medios de soporte. Por ejemplo, la fosfatasa alcalina hidroliza el *p*-nitrofenilfosfato en *p*-nitrofenol, el cual tiene un color amarillo a un pH de 8.0. La inmersión de un gel en tales soluciones produce bandas coloreadas en donde están las enzimas. Si el producto de la actividad enzimática es de bajo peso molecular, la difusión rápida del producto puede ampliar la zona, dificultando la localización de la enzima o la identificación de la isoenzima. Los productos que forman polímeros o sustancias insolubles son mejores, pero si esto no fuese posible, puede utilizarse un método de impresión por contacto.[ref\(285\)](#) Una hoja de papel u otro material se impregna con un sustrato cromóforo y se presiona contra un soporte que contiene la enzima o las enzimas separadas. Con frecuencia el soporte se corta en secciones, las cuales se incuban en la solución de análisis. Una lista de tales zimogramas se presenta en el texto de Righetti y Drysdale.[ref\(286\)](#)

Otras técnicas de localización

Una técnica común para la localización de proteínas y ácidos nucleicos emplea marcadores radioactivos, tales como el ^{125}I ó ^{14}C , incorporados dentro de las macromoléculas. Luego de la electroforesis, se coloca una placa de película de rayos X en contacto con el soporte estacionario en la oscuridad por 12 a 24 horas. Luego del revelado de la película, se observa un área oscura correspondiente a la posición de la macromolécula marcada radiactivamente. Esta técnica, la *autoradiografía*, se emplea comúnmente en la técnica de electrotransferencia de proteínas y también se utiliza en la técnica de transferencia Southern para ácidos nucleicos.

En la Tabla 10-5 se presentan algunos problemas comúnmente hallados en la electroforesis, sus causas más probables y las acciones correctivas sugeridas.



Aplicaciones Clínicas

Para las investigaciones clínicas se requieren de una alta sensibilidad de detección del compuesto analizado, alta resolución de las zonas adyacentes compuesto analizado y alta reproducibilidad de separación. Para el trabajo clínico de rutina, se opta por la velocidad a costa de la resolución y sensibilidad de detección; la reproducibilidad permanece importante pero se asegura por el uso frecuente de muestras para comparación de individuos sanos.

Los usos más comunes de las técnicas de electroforesis en el laboratorio de hoy en día son los siguientes:

1. Electroforesis de proteínas específicas
 - a. Análisis cuantitativo de clases de proteínas séricas específicas, tales como las gama globulinas y albúmina (ver Capítulos 49 y 27, respectivamente)
 - b. Identificación y cuantificación de la hemoglobina y subclases (ver Capítulo 36)
 - c. Identificación de proteínas monoclonales, tales como las gama globulinas de Bence Jones en suero u orina (ver Capítulo 49)
 - d. Separación y cuantificación de las principales clases de lipoproteínas (ver Capítulos 33 y 53)
2. Análisis de isoenzimas: separación y cuantificación de enzimas tales como la creatina cinasa, lactato deshidrogenasa y fosfatasa alcalina en sus respectivos subtipos moleculares (ver Capítulos 27 y 31)
3. Inmunolectroforesis: más frecuentemente empleada para determinar cualitativamente la elevación o deficiencia de clases específicas de inmunoglobulinas; también puede utilizarse para el análisis semicuantitativo de las proteínas séricas, como la transferrina y componentes del complemento C3 (ver Capítulo 12).
4. Técnica de electrotransferencia para identificar una proteína específica: utilizada para confirmar la presencia de anticuerpos contra el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (ver Capítulo 12).
5. Técnicas de transferencia de Southern para identificar secuencias específicas de ácidos nucleicos (DNA o RNA) (ver Capítulo 48): utilizadas para el diagnóstico prenatal de errores congénitos, diagnóstico de infecciones virales, e identificación de factores de riesgo para el cáncer (ver Capítulo 49).

Los procedimientos bidimensionales reemplazarán indudablemente algunos o todos los procedimientos previos, pero en la actualidad se realizan más bien trabajos exploratorios. Todos los procedimientos involucran la medición de las alteraciones en un patrón electroforético comparado con un control normal. Uno puede a menudo utilizarlos para diagnosticar enfermedades específicas^{refs(287)} (Fig. 10-5). Por ejemplo, el síndrome nefrótico puede estar acompañado de una disminución de más del 25% en los niveles de la alfa₂ globulina y una disminución de hasta 25% en los niveles de gama globulina, debido a la pérdida de proteínas de bajo peso molecular en la orina. El patrón de disminución o aumento en varias condiciones patológicas es bastante característico y por lo tanto la cuantificación de las tiras de acetato de celulosa resulta útil para el diagnóstico.

El soporte teñido, si es una tira, puede ser colocado en un aparato de barrido de tiras o en caso contrario, en un espectrofotómetro modificado ("densitómetro"). Algunas veces deben

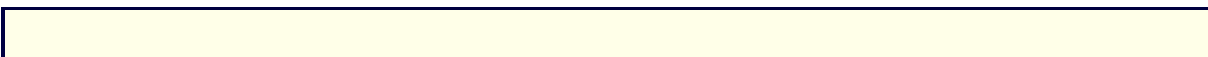


“clarificarse” los soportes de acetato de celulosa (hacerlos más transparentes) antes del análisis por densitometría. Esto se realiza sumergiendo el soporte en un solvente. Con el debido cuidado, la absorbancia del colorante en el soporte es una buena medición de la cantidad de proteínas. En la electroforesis en acetato de celulosa, un suero normal se coloca próximo al suero que se analiza. La gráfica de la absorbancia (color) contra la distancia obtenida en el aparato de barrido para tiras (ver Fig. 10-5) permite una comparación inmediata de las cantidades relativas de cada clase de las proteínas separadas. La electroforesis clínica de rutina como la de las muestras de suero, puede realizarse mediante la utilización de instrumentos altamente automatizados. Varias firmas comerciales venden estos equipos como Beckman, Ciba-Corning, y Helena Laboratories.

La electroforesis se utiliza algunas veces en el análisis de defectos genéticos. Las técnicas bidimensionales que se desarrollan actualmente tienen un tremendo potencial en dicha área. La Tabla 10-6 presenta una lista de los compuestos que normalmente se separan por electroforesis.

Referencias

1. Van Holde KE: *Physical biochemistry*, ed 2, Englewood Cliffs, N.J., 1985, Prentice-Hall.
2. Moore WJ: *Physical chemistry*, ed 4, Englewood Cliffs, N.J., 1970, Prentice-Hall.
3. Tanford C: *Physical chemistry of macromolecules*, New York, 1961, Academic Press.
4. Melvin M: *Electrophoresis*, New York, 1987, Wiley & Sons.
5. Righetti PG, Van Oss CJ, Vanderhoff JW: *Electrokinetic separation methods*, New York, 1979, Elsevier/North Holland.
6. Deyl Z, Everaerts FM, Prusik Z, Svendsen PJ: Electrophoresis: a survey of techniques and applications, *J Chromatogr* 18 (series), 1979.
7. Ornstein L: Disc electrophoresis, *Ann NY Acad Sci* 121:321, 1964.
8. Brewer JM, Ashworth RB: Disc electrophoresis, *J Chem Educ* 46:41, 1969.
9. Jovin TM, Dante ML, Chrambach A: *Multiphasic buffer systems output PB 196085 to 196092 and 203016*, Springfield, Va., 1970, National Technical Information Service.
10. Fagerhold MK, Laurell CB: The Pi system-inherited variants of serum alpha-1-antitrypsin, *Prog Med Genet* 7:96, 1970.
11. Andrews AT: *Electrophoresis: theory, techniques, and biochemical and clinical applications*, ed 2, New York, 1986, Oxford University Press.
12. Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227:680, 1970.
13. Wyckoff M, Rodbard D, Chrambach A: Polyacrilamide gel eletrophoresis in sodium dodecyl sulfate-containing buffers using multiphasic buffer systems, *Anal Biochem* 78:459, 1977.
14. O Farrell PH: High-resolution two-dimensional electrophoresis of proteins, *J Biol Chem* 250:4007, 1975.
15. Dunn MJ, editor: *Electrophoresis '86*, Deerfield Beach, Fla., 1986, VCH Verlagsgesellschaft.
16. Lemkin PF, Lipkin LE: GELLAB: a computer system for 2D gel electrophoresis analysis. II. Pairing spots, *Comput Biomed Res* 14:355, 1981.
17. Towbin H, Staehelin T, Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets, *Proc Nat Acad Sci USA* 76:4350, 1979.
18. Allington RW, Nelson JW, Aron GG: *ISCO Applications Research Bulletin, no 18*, Lincoln, Neb., 1975, Instrumentation Specialties Co. (ISCO, Inc.).
19. Green MR, Pastewka JV: Identification of sialic acil-rich glycoproteins on polyacrylamide gels, *Anal*



- Biochem* 65:66, 1975.
20. Merrill CR, Goldman D, Sedman SA, Ebert MH: Ultrasensitive stain for proteins in polyacrilamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins, *Science* 211:1437, 1981.
 21. Righetti PG, Drysdale JW: *Isoelectric focusing*, New York, 1976, Academic Press.
 22. Annino JS, Giese RW: *Clinical chemistry, principles and procedures*, ed 4, Boston, 1976, Little, Brown & Co.
 23. Righetti PG: *Isoelectric focusing: theory, methodology and applications*, ed 2, vol 5, Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology, New York, 1983, Elsevier Biomedical Press.
 24. Foret F, Bocek P: Capillary electrophoresis. In Chrambach A, Dunn MJ, Radola BJ, editors: *Advances in electrophoresis*, vol 3, New York, 1989, VCH Publishers.

Tablas

Tabla 10-1. Técnicas de resolución aumentada.

Técnica:	Isotacoforesis
Base física:	Neutralidad eléctrica; la corriente en circuito en serie es constante. refs(288) La solución de baja conductividad luego de una solución de mayor conductividad debe moverse a la misma velocidad y transportar la misma corriente y por lo tanto las dos soluciones experimentan diferentes voltajes y ajustan la concentración. refs(289)
Mecanismo:	La solución de menor conductividad conteniendo el ion de menor movilidad migra detrás de la solución de mayor conductividad que contiene ion de mayor movilidad (e.g., cloro); ion de movilidad intermedia (e.g., proteína) en sandwich; la concentración de la proteína aumenta para transportar la misma corriente que los iones de menor y mayor movilidad
Efecto:	Los iones de movilidad intermedia (e.g., proteínas) se acumulan en zonas concentradas finas y se mueven en zonas discretas.
Limitaciones:	Los iones no se separan; la resolución no es tan buena como en la electroforesis en disco.
Ventajas y usos:	Actualmente no tiene aplicación clínica ampliamente difundida.
Técnica:	Electroforesis en disco
Base física:	Las movilidades efectivas de algunos iones son pH dependientes; se utiliza con frecuencia con geles de poliacrilamida.
Mecanismo:	Como en la técnica anterior, las proteínas apiladas son cubiertas por los siguientes iones debido al cambio de pH; el cambio de pH se produce utilizando un contraíón.
Efecto:	Las proteínas, ahora en zonas estrechas, migran independientemente.
Limitaciones:	Sistemas de iones y pH limitados; técnicamente más

Ventajas y usos:	exigente que la electroforesis ordinaria. Alta sensibilidad y poder de resolución; utilizado ampliamente para separar proteínas, se usa más como herramienta de investigación.
Técnica:	Enfoque isoelectrico ^{refs(290)}
Base física:	La migración de los iones debe ocurrir en ambas direcciones; los iones anfóteros (con grupos básicos y ácidos) tienen movilidad efectiva cero y carga neta cero en sus puntos isoelectricos.
Mecanismo:	El movimiento del ion se detiene debido a la concentración cero del contraión, dejando todos los iones ordenados y apilados en un gradiente de pH; los iones que viajan al frente y los de cola son un ácido y una base.
Efecto:	Proteínas en zonas en los puntos isoelectricos (isoiónico); el gradiente de pH es amortiguado por los anfolitos transportadores.
Limitaciones:	Más complicado y exigente que la electroforesis ordinaria.
Ventajas y usos:	Alta capacidad y es posible una resolución de hasta 0.01 unidades de pH; primariamente una herramienta de investigación.

Tabla 10-2. Uso de los medios de soporte en la separación.

Separación basada en el tamaño molecular	
Método:	Geles de gradiente ^{ref(291)}
Principio:	Geles solidificados con concentraciones crecientes que van del origen al final del gel, tienen un gradiente de tamaño de poros
Efecto:	Las macromoléculas más grandes se mueven más lentamente a medida que encuentran concentraciones mayores de gel; pueden medirse tamaños relativos y cargas
Limitaciones:	Difícil reproducción del gel
Ventajas y usos:	Herramienta de investigación
Método:	Geles conteniendo desnaturizantes ^{refs(292)}
Principio:	Los geles se solidifican con desnaturizantes (como urea o SDS) de tal forma que las macromoléculas migran en forma desnaturizada; el SDS se une uniformemente y en grandes cantidades a la mayoría de las proteínas.
Efecto:	Las proteínas en SDS y los oligonucleótidos migran de modo inversamente proporcional a los pesos moleculares de las subunidades o número de nucleótidos.
Limitaciones:	Técnica exigente; los puentes disulfuros en las proteínas deben romperse; no todas las proteínas se comportan normalmente.
Ventajas y usos:	Herramienta de investigación
Separaciones basadas en el tamaño molecular y carga	
Método:	Electroforesis en gel ^{ref(293)}
Principio:	El tamaño del poro es lo suficientemente pequeño como



Efecto:	para restringir la difusión Mayor resolución
Limitaciones:	Reproducibilidad
Ventajas y usos:	Mejor resolución que el acetato de celulosa; los geles de agarosa son muy utilizados; esencialmente es una herramienta de investigación.
Método:	Métodos inmunolectroforéticos (ver Capítulo 12)
Principio:	La electroforesis permite unir el antígeno y el anticuerpo para formar un precipitado.
Efecto:	Puede identificarse y cuantificarse un antígeno o anticuerpo específico.
Limitaciones:	Sensibilidad algo baja
Ventajas y usos:	Amplio uso clínico (como en la inmunolectroforesis en cohete, ("rocket"))
Método:	Electroforesis bidimensional ^{ref(294)}
Principio:	La separación ocurre de acuerdo a un parámetro (por ej. el punto isoelectrico) en una dimensión (dirección) y luego de acuerdo a un segundo parámetro (por ej. tamaño) en ángulo recto.
Efecto:	La mezcla de proteínas se extiende sobre una superficie; la información es proporcional al cuadrado de la longitud del lado de la superficie. ^{refs(295)}
Limitaciones:	Técnica exigente; difícil reproducción de los patrones.
Ventajas y usos:	Gran contenido informático; ampliamente usado en investigaciones clínicas.
SDS, Duodecil sulfato de sodio (siglas en Inglés de Sodium dodecyl sulfate)	

Tabla 10-3. Efectos comunes de los parámetros electroforéticos en la separación.

Parámetro	Efecto en la electroforesis
pH	Cambia la carga del compuesto analizado y por lo tanto la movilidad efectiva; puede afectar la estructura del compuesto analizado, ya sea desnaturizando o disociando la proteína.
Fuerza iónica	Cambia el voltaje o corriente; una fuerza iónica aumentada generalmente reduce la velocidad de migración y aumenta el calentamiento.
Presencia de iones	Puede cambiar la velocidad de migración si la interacción es fuerte; puede causar la formación de colas en las bandas.
Corriente	Una corriente muy elevada causa sobrecalentamiento.
Voltaje	La velocidad de migración es proporcional al voltaje
Temperatura	Los gradientes de temperatura en los medios de soporte causan bandas arqueadas. El sobrecalentamiento puede desnaturizar (precipitar) las proteínas. Menores temperaturas reducen la difusión pero también reducen la velocidad de migración; no tiene efecto sobre la resolución.



Tiempo	La separación de las bandas (resolución) aumenta linealmente con el tiempo, pero la dilución de las bandas (difusión) aumenta con la raíz cuadrada del tiempo.
Medio	Los principales factores son la endósmosis y los efectos del tamaño del poro, los cuales afectan las velocidades de migración.

Tabla 10-4. Colorantes empleados comúnmente para varias sustancias.

Sustancia	Colorante	Comentarios
Proteínas	Ponceau S ¹	Menos sensible que el negro amido, pero más específico para las proteínas; es el colorante más ampliamente utilizado
	Azul de bromofenol ²	Baja sensibilidad, pero puede utilizarse con geles de anfolitos
	Verde claro SF ²	
	Azul brillante de ¹ Coomassie R250	Puede detectar menos de 0.2 µg de proteínas; puede utilizarse con geles de anfolitos
	Tinción de Plata (plata reducida sobre macromoléculas oxidadas) ³	10 a 50 veces más sensible que el Coomassie; diferentes proteínas dan diferentes colores, por razones desconocidas
	Stains-All (un colorante catiónico de carbocianuro) ⁴	Sensibilidad general, incluyendo las fosfoproteínas
	Negro amido 10B ("negro búfalo") ⁵	Tinción muy sensible, pero su sensibilidad es un décimo de la sensibilidad del Coomassie
Lipo- proteínas	Oro coloidal	Cerca de 100 veces más sensible que el Coomassie; es el colorante para proteínas mas sensible disponible en la actualidad; se utiliza con el Western blot
	Negro Sudan ⁶ Rojo oleoso O ⁷	

	Azul brillante Coomassie R250 ⁸	Usado con geles de SDS (duodecil sulfato de sodio)
Glico- proteínas	PAS (Schiff-ácido peryódico) ⁹	El mejor para glicoproteínas neutras; detecta 2 a 3 µg de carbohidratos
	Stains-All ⁴	El mejor para glicoproteínas ricas en ácido siálico y para mucopolisacáridos
Acidos nucleicos	Stains-All ⁴	El mejor para RNA, DNA
	Plata ⁴	2 a 5 veces más sensible que el bromuro de etidio
	Bromuro de etidio ¹⁰	Bandas fluorescentes con el DNA; detecta menos de 10 ng
	TOTO-1 ¹¹	Bandas fluorescentes con el DNA; detecta 4 pg
Enzimas: Deshidro- genasas	NADH (fluorescencia) ¹²	
	Cloruro de nitroblue tetrazolium ¹²	
Esterasas	Ésteres de Beta-naftil y tetraazo ¹² o-dianisidina	
Colinesterasas		
Fosfatasas	1-Naftil fosfato y fast blue B ¹²	

Nota: Los factores de sensibilidad proporcionados son valores promedios; diferentes proteínas se teñirán con diferente intensidad con los colorantes.

¹Righetti PG, Drysdale JW: *Isoelectric focusing*, New York, 1976, Academic Press.

²Chapter 22, reference 7.

³Merril CR, Goldman D, Sedman SA, Ebert MH: *Science* 211:1437, 1981.

⁴Green MR, Pastewka JV, Peacock AC: *Anal Biochem* 56:43, 1973.

⁵Wilson CM: *Anal Biochem* 96:263, 1979.

⁶Swahn B: *Scand J Clin Invest* 4:98, 1952.

⁷Weller H: *Klin Wochenschr* 36:563, 1958.

⁸Matthieu JM, Quarles RH: *Anal Biochem* 55:313, 1973.

⁹Brunk, CF, Simpson L: *Anal Biochem* 82:455, 1977.

¹⁰Gabriel O: *Methods Enzymol* 22:578, 1971.

¹¹Gershon J, Palade G: *Anal Biochem* 11, 1983.

¹²Glazer AH, Rye HS, Quesada MA, Mathies RA: *Proc Nat Acad Sci USA* 87:3851, 1990.



Tabla 10-5. Problemas hallados comúnmente en la electroforesis.

Problema:	No hay migración
Causa probable:	Instrumento desconectado, pH incorrecto; conexión de los electrodos invertida
Acción correctiva:	Verificar los circuitos eléctricos Verificar el punto isoelectrico de la proteína y el pH del amortiguador; verificar la polaridad del electrodo
Problema:	Patrón electroforético arqueado en los extremos del soporte
Causa probable:	Sobrecalentamiento o secado del soporte
Acción correctiva:	Cámara de humedad; verificar la fuerza iónica del amortiguador; reducir el voltaje.
Problema:	Formación de colas en las bandas
Causa probable:	Reacción química: subunidad disociación o adsorción al soporte. Sal en la muestra
Acción correctiva:	Utilizar un soporte diferente; probar un pH diferente Verificar las sales en la muestra; dializar la muestra contra el amortiguador de electroforesis
Problema:	Agujeros en el patrón de tinción.
Causa probable:	Efecto del co-ion del amortiguador. Compuesto analizado presente en muy alta concentración
Acción correctiva:	Utilizar un co-ion del amortiguador diferente Aplicar una muestra menos concentrada
Problema:	Bandas muy finas y definidas
Causa probable:	Peso molecular de la muestra muy alto para el tamaño del poro del soporte. Oxidación del sulfhidrilo y agregación. Correr la muestra con un reductor del sulfhidrilo o a menor pH.
Acción correctiva:	Utilizar un soporte de poros más grandes.
Problema:	Migración muy lenta
Causa probable:	Peso molecular elevado Baja carga Fuerza iónica muy alta. Voltaje muy bajo
Acción correctiva:	Utilizar un soporte de poros más grandes Cambiar el pH de tal forma que aumente la carga. Verificar la conductividad; diluir el amortiguador. Aumentar el voltaje.
Problema:	La muestra precipita en el soporte
Causa probable:	pH muy alto o bajo Calentamiento excesivo
Acción correctiva:	Correr a un pH diferente Utilizar un voltaje menor o enfriamiento externo

Tabla 10-6. Compuestos comúnmente separados por electroforesis.

Clase de compuesto	Colorante	Medio de soporte
Aminoácido	Ninhidrina	Papel, acetato de celulosa
Proteína sérica	Ponceau S	Acetato de celulosa
isoeléctrico)	Azul de Coomassie 250	Poliacrilamida (con o sin enfoque
Glicoproteínas	Lipoproteínas	Rojo oleoso O Agarosa
Acidos nucleicos	Acido peryódico-Schiff	Agarosa
	Bromuro de etidio (fluorescente)	Agarosa
Hemoglobinas	Plata <i>o</i> - Dianisidina	Acetato de celulosa, agar
	Ferricianuro	
	Peróxido	
Isoenzimas		
Lactato	NADH fluorescente	Agarosa
deshidrogenasa	o tetrazolium	
Creatina cinasa	NADH fluorescente o	Agarosa
	tetrazolium	
Fosfatasa alcalina	1-Naftilfosfato + fast blue	Poliacrilamida, acetato
	B o 5-bromo-4-	de celulosa
	cloroindol fosfato	
Inmunoglobulinas	Azul de Coomassie 250	Agarosa
Antígenos específicos	Negro amido 10B	Agarosa
por técnicas		
electroforéticas		
inmunológicas (Ej: Laurell, "cohetes")		

Figuras

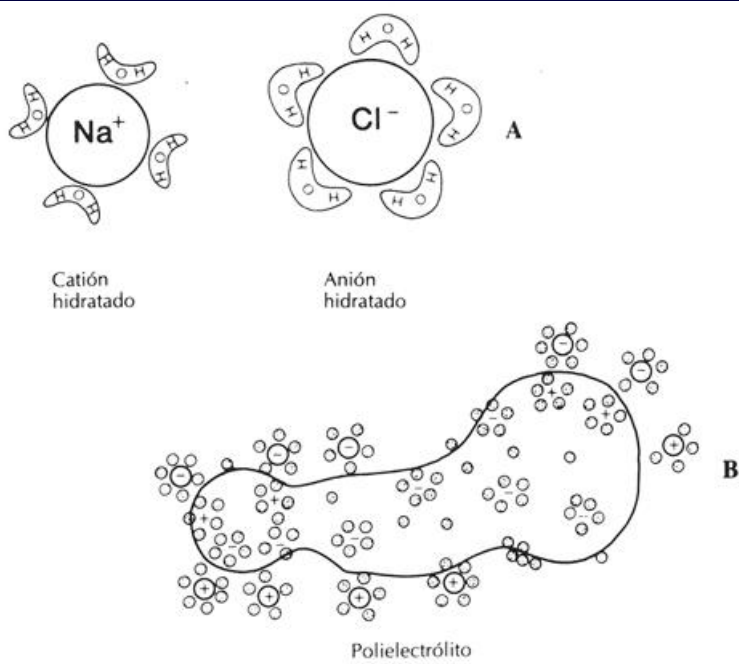


Figura 10-1 Estado de las partículas cargadas en solución acuosa. A, Iones pequeños (Na^+ y Cl^-) con moléculas asociadas de agua. B, Macromolécula con moléculas de agua (pequeños círculos punteados) asociadas con grupos cargados y polares. Los co-iones y contraiones hidratados se muestran también como círculos más grandes conteniendo signos menos o más.

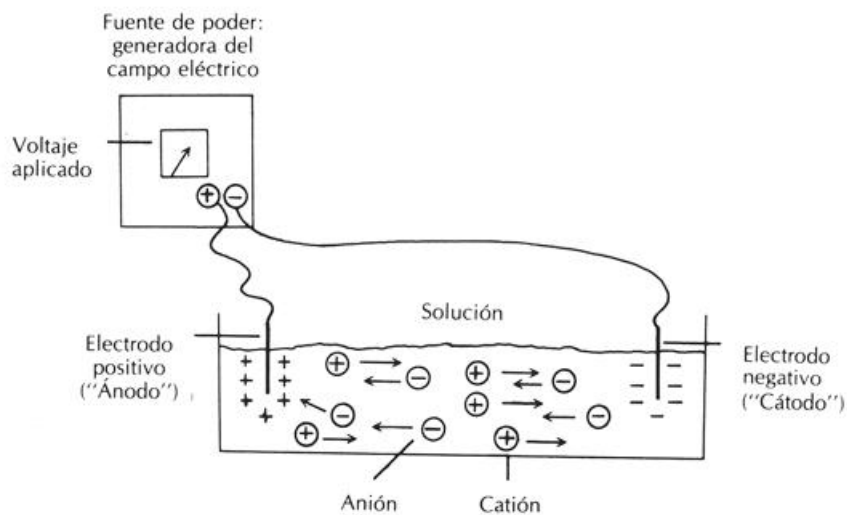
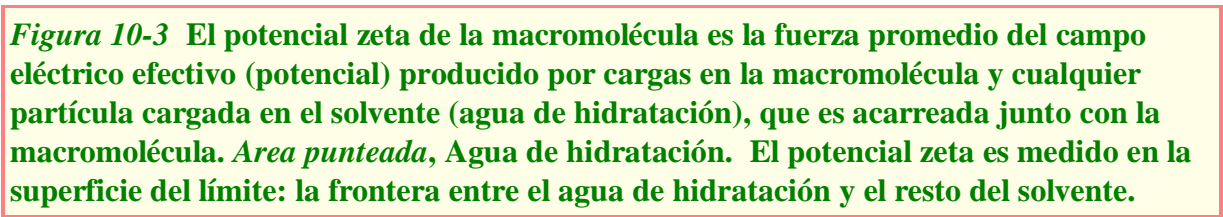


Figura 10-2 La aplicación de un campo eléctrico a una solución iónica hace que los

iones se movilicen.



mezcla de acrilamida y un derivado bifuncional de acrilamida (forma entrecruzamientos de cadenas). El derivado que se muestra es de uso común.

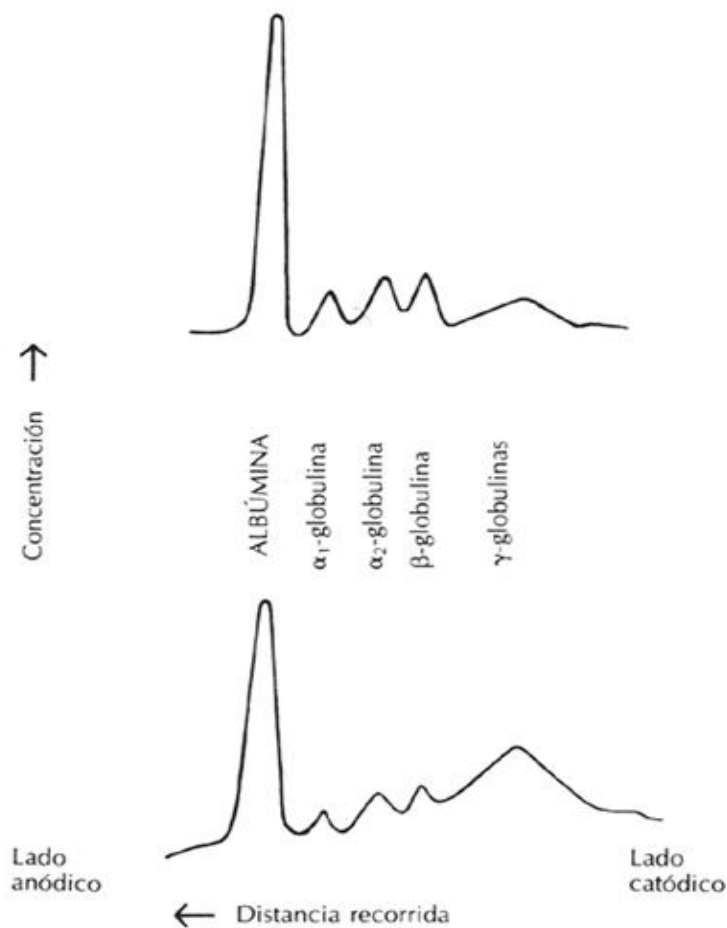


Figura 10-5 Ejemplo del efecto de la enfermedad, cirrosis hepática, sobre el patrón electroforético de proteínas séricas. *Perfil superior*, Distribución característica de individuos sanos.

CAPÍTULO 11

11. Reacciones Inmunológicas

Susan Bassion



Antígenos

Factores que afectan la antigenicidad

Anticuerpos

Estructura

Inmunoglobulina G

Inmunoglobulina M

Inmunoglobulina A

Inmunoglobulina D

Inmunoglobulina E

Reacciones antígeno-anticuerpo

Fuerzas de unión

Fuerzas de afinidad

Heterogeneidad de la respuesta inmune

Avidez de los anticuerpos

Reactividad cruzada

Bases genéticas de la diversidad de anticuerpos

Reacciones de precipitación antígeno-anticuerpo

Curva de precipitación

Teoría de la red

Otros factores que afectan la precipitación

Reacciones de precipitación en gel

Objetivos

- Definir antígeno y anticuerpo
- Enumerar y explicar ocho factores que afectan la antigenicidad. Describir la composición y las diferencias estructurales de los anticuerpos. Nombrar cinco inmunoglobulinas humanas y describir el papel fisiológico de cada una de ellas.
- Enumerar y explicar de las fuerzas involucradas en las reacciones antígeno-anticuerpo y los factores que influyen en la especificidad de las reacciones inmunoquímicas.
- Resumir el mecanismo de las siguientes reacciones antígeno-anticuerpo de precipitación en gel y establecer el principio de cada una de ellas:
 - Doble inmunodifusión
 - Inmunodifusión radial

Términos clave

afinidad Medida de la fuerza de unión de la reacción antígeno-anticuerpo.

anticuerpos Proteínas que se combinan específicamente con antígenos.

determinante antigénico Porción de un antígeno que reacciona con el anticuerpo.

antígenos Sustancias que inducen una respuesta inmune.

avidéz Medida de la fuerza de unión de los anticuerpos a múltiples determinantes antigénicos en antígenos naturales.

cadena ligera Porción de una molécula de inmunoglobulina compuesta de una cadena



polipeptídica de alrededor de 22,000 daltones.

cadena de unión (j) Porción de la molécula de IgM que posiblemente sostiene a la molécula unida.

cadena pesada Porción de la molécula de inmunoglobulina consistente de una cadena polipeptídica de alrededor de 50,000 daltones.

células B Linfocitos B que se transforman a células plasmáticas y producen anticuerpos.

células plasmáticas Células productoras de inmunoglobulinas que constituyen el estadio final de la diferenciación de los linfocitos B.

fragmento Fac Porción de la molécula de inmunoglobulina obtenida por degradación con papaína y que contiene el sitio de combinación del anticuerpo; compuesto por la cadena liviana y una porción de la pesada.

fragmento Fc Porción de la molécula de inmunoglobulina obtenida por degradación con papaína que contiene la mayor parte de la cadena pesada (incluyendo al sitio de unión al complemento).

floculación Reacción de precipitación que produce precipitados grandes y laxos.

haptenos Sustancias de bajo peso molecular que pueden inducir una respuesta inmune sólo cuando se las acopla con moléculas inmunogénicas de alto peso molecular.

idiotipo Porción de la molécula de inmunoglobulina que le confiere un carácter único, la mayoría de las veces incluye su sitio de unión.

inmunoglobulinas (Ig) Proteínas con actividad de anticuerpo.

porción secretora Cadena polipeptídica unida a la IgA (puede participar en la secreción dentro de los espacios de las mucosas).

reacción de precipitación o línea de precipitación Se refiere a la precipitación de antígenos y anticuerpos en gel. La línea de precipitación es un complejo insoluble formado por proteínas, antígenos, y anticuerpos que se produce cuando sus concentraciones relativas son aproximadamente equivalentes u óptimas para la formación de la red.

reactividad cruzada Unión de un anticuerpo a un antígeno diferente al que generó la respuesta inmune.

red La estructura tridimensional de unión entrecruzada formada por la reacción de antígenos multivalentes con el anticuerpo.

región constante Extremo carboxilo de las cadenas ligeras y pesadas, altamente conservado. No forma parte del sitio de combinación del anticuerpo.

regiones hipervariables Secuencias de aminoácidos en la región variable que tienen un aumento en la probabilidad de variación.

región variable Porción N-terminal de las cadenas ligeras y pesadas cuyas secuencias de aminoácidos pueden cambiar; esta región incluye al sitio de unión al antígeno.

valencia El número efectivo de determinantes antígenicos en una molécula de antígeno. También se la utiliza para describir el número de sitios de unión del anticuerpo.

zona de equivalencia Región de la reacción de precipitación antígeno anticuerpo en la que las concentraciones de ambos reactivos son iguales.

Las reacciones inmunológicas se producen entre dos tipos de sustancias, *antígenos* y *anticuerpos*. Este capítulo analiza estas sustancias y las interacciones entre ellas.



Antígenos

Los *antígenos* o *inmunógenos* se definen como sustancias que inducen una respuesta inmune. La respuesta inmune generada puede ser humoral (producción de un anticuerpo) o celular (producción de células sensibilizadas). En general, tanto la respuesta humoral como la celular son estimuladas.

Factores que afectan la antigenicidad

Muchos factores determinan la antigenicidad de una molécula. La naturaleza y la dosis del antígeno, la vía de administración, el organismo inmunizado, y la sensibilidad del método de detección son factores importantes en la evaluación de la antigenicidad. Además deben cumplirse múltiples condiciones adicionales para que una molécula sea inmunogénica. Estas condiciones se discuten a continuación.

Naturaleza química.

Los primeros antígenos investigados fueron las bacterias y los eritrocitos, que son estructuras macromoleculares complejas compuestas de una gran cantidad de diferentes proteínas, carbohidratos, y lípidos. Investigaciones posteriores han demostrado que los inmunógenos se encuentran en diversas clases de compuestos, incluyendo, proteínas, polisacáridos, glicolípidos, ácidos nucleicos, y polinucleótidos.

Tamaño.

No existe requerimiento estricto de tamaño, pero éste es de considerable importancia en la determinación de la antigenicidad de una molécula. Los inmunógenos más potentes son macromoléculas con pesos moleculares mayores de 100,000 daltones. Las cadenas polipeptídicas A y B de la insulina (2,500 daltones) y del glucagon (3,600 daltones) son inmunogénicas en los cobayos. Sin embargo, la mayoría de las moléculas que tienen menos de 10,000 daltones son inmunogénicamente débiles o no inmunogénicas en absoluto.

Haptenos.

Las sustancias con bajos pesos moleculares pueden inducir una respuesta inmune cuando se conjugan con moléculas *acarreadoras* inmunogénicas de pesos moleculares altos. Tales antígenos incompletos o haptenos, no evocan una respuesta inmune por sí mismos pero reaccionan con anticuerpos. Se ha demostrado que muchos compuestos de bajo peso molecular actúan como haptenos, incluidos los monosacáridos, lípidos, péptidos, y hormonas como la hormona adrenocorticotrópica y las prostaglandinas, toxinas como la arsfenamida, y fármacos como los barbitúricos y sulfonamidas.

Complejidad.

Una molécula debe exhibir un cierto grado de complejidad química para que sea antigénica. Se ha demostrado que los homopolímeros sintéticos de aminoácidos compuestos de unidades repetidas de un único aminoácido son inmunógenos débiles; los copolímeros de dos o tres aminoácidos son mucho mejores inmunógenos. El aumento de la inmunogenicidad es una consecuencia del aumento de la complejidad. Por ejemplo, al añadir aminoácidos aromáticos residuales, como la tirosina, a los copolímeros sintéticos de aminoácidos aumentan su inmunogenicidad.



Determinantes antigénicos.

La porción del antígeno involucrada en la reacción con el anticuerpo, se denomina *determinante antigénico*, o *epítope*. Un antígeno puede contener mas de un tipo de determinantes antigénicos; el número de determinantes antigénicos por antígeno varía con el tamaño y complejidad de la molécula (Fig. 11-1). El número efectivo de determinantes antigénicos en un antígeno, constituye su *valencia*. Es decir, el número de moléculas de anticuerpo que pueden unirse a un antígeno al mismo tiempo (ver Fig. 11-1). Los anticuerpos reconocen la conformación tridimensional de un determinante antigénico (determinante antigénico conformacional), así como la estructura básica de aminoácidos (determinante antigénico secuencial). El número de aminoácidos de un determinante antigénico puede ser tan pequeño como cuatro residuos. El sitio de unión de una molécula de anticuerpo reacciona con un determinante antigénico de una manera complementaria, como una llave en una cerradura, o como una interacción enzimática. La afinidad de un anticuerpo con un determinante antigénico es directamente proporcional a la exactitud del ajuste.

Conformación y accesibilidad.

La estructura terciaria o pliegue espacial de las moléculas es un factor significativo para su inmunogenicidad. Los anticuerpos contra las proteínas nativas no reaccionan con moléculas desnaturalizadas. Los anticuerpos contra proteínas nativas están dirigidos principalmente contra la conformación mas que contra la secuencia de los determinantes antigénicos. Además, la accesibilidad o exposición al medio es un factor importante en la determinación de la inmunogenicidad. La cadena lateral terminal de polisacáridos, las porciones de una molécula de polisacárido que sobresalen de la porción principal de la molécula, son las regiones inmunogénicas más potentes de los antígenos polisacáridos. La accesibilidad de un antígeno al medio está relacionada con la solubilidad del mismo en un medio acuoso. Cuanto más soluble es un antígeno, mayor es la probabilidad que interactúe con un anticuerpo. La influencia de la carga en la inmunogenicidad puede ser una manifestación de la accesibilidad. Los residuos cargados o hidrofílicos están más en contacto con el medio que los residuos hidrofóbicos, los cuales tienden a estar secuestrados en el interior de las moléculas.

Carácter ajeno.

El sistema inmune es capaz de distinguir lo *propio* de lo *no propio* de tal manera que, bajo circunstancias normales, una respuesta inmune intensa se produce solamente frente a sustancias reconocidas como extrañas. Cuanto más distante es la relación evolutiva entre el antígeno y el huésped, más inmunogénica es la molécula. Por lo tanto, la albúmina de cobayo no provocará una respuesta inmune cuando es inyectada en otro cobayo. Sin embargo, la misma albúmina de cobayo provocará una fuerte respuesta inmune si se inyecta en un vertebrado superior, sea éste un conejo o un mono.

Genética.

Recientemente se ha demostrado que la capacidad de reconocer un antígeno y la fuerza de la respuesta inmune producida, puede ocurrir bajo estricto control genético. Algunas cepas de ratones inyectadas con polipéptidos sintéticos, son capaces de producir una respuesta inmune vigorosa. Otros ratones, con un patrón genético no idéntico pero estrechamente relacionados



con las anteriores, producen poca o ninguna respuesta.

En resumen, muchos factores afectan la inmunogenicidad de un antígeno: naturaleza química, tamaño, complejidad molecular, configuración, accesibilidad, carácter ajeno y genética.

Anticuerpos

Se denominan *anticuerpos* a las proteínas que se combinan específicamente con los antígenos. Los anticuerpos se producen a partir de una subpoblación de linfocitos, llamados *linfocitos B*, y su progenie, las *células plasmáticas*. Los linfocitos B, por medio de su producción de anticuerpos, son responsables del fenómeno de la inmunidad humoral. A las proteínas con actividad de anticuerpos también se las denominan *inmunoglobulinas*. Las inmunoglobulinas son un grupo de moléculas sumamente heterogéneas que constituyen aproximadamente el 20% de las proteínas plasmáticas. Las inmunoglobulinas son heterogéneas en cuanto a su especificidad antigénica, secuencia de aminoácidos, migración dentro de un campo eléctrico, y carácter funcional. Existen alrededor de 10,000 moléculas diferentes circulando por el cuerpo humano que pueden ser clasificadas como inmunoglobulinas.

Estructura

El descubrimiento de que las proteínas electroforéticamente homogéneas halladas en el suero de pacientes con mieloma múltiple eran estructuralmente homogéneas y estrechamente relacionadas con las inmunoglobulinas normales, fue un avance importante en el estudio de la estructura de las inmunoglobulinas. Tales proteínas del mieloma se pudieron aislar en grandes cantidades y ser caracterizadas químicamente. Estos estudios posibilitaron el entendimiento de la estructura precisa de la molécula del anticuerpo.

Cadenas H y L

Los anticuerpos son glicoproteínas compuestas de 82% a 92% de polipéptidos y 4% a 18% de carbohidratos. Todas las moléculas de inmunoglobulinas tienen una estructura común de 4 cadenas de polipéptidos. Dos cadenas grandes o *pesadas* idénticas (cadenas H) y dos pequeñas o *ligeras* idénticas (cadenas L) están unidas por fuerzas no covalentes y puentes disulfuros covalentes entre las cadenas (Fig. 11-2).

La porción de carbohidrato de la molécula de inmunoglobulina está covalentemente unida a aminoácidos en las cadenas polipeptídicas. Los carbohidratos se encuentran generalmente unidos a la mitad C-terminal (Fc) de la molécula. Sus funciones se conocen muy poco, pueden estar involucradas en el transporte de la molécula o en la protección a la degradación metabólica.

Fragmentos Fac y Fc

La digestión enzimática de las moléculas de inmunoglobulinas ha proporcionado mayores evidencias acerca de su estructura (ver Fig. 11-2). La digestión con la papaína divide la molécula en la porción N-terminal de las uniones disulfuro, produciendo tres fragmentos de tamaños aproximadamente iguales. Dos de estos fragmentos son idénticos y retienen la capacidad de unirse al antígeno asociado con la molécula intacta de inmunoglobulina. Los



fragmentos con el sitio de unión del anticuerpo, *fragmentos Fac*, están compuestos cada uno por una cadena ligera entera y una porción de cadena pesada. El tercer fragmento no tiene actividad de unión al antígeno y es cristizable, *fragmento Fc*. El fragmento Fc retiene las otras actividades biológicas asociadas con las moléculas de inmunoglobulinas: interacción con el sistema de complemento y unión al tejido. El fragmento Fc está constituido por la mitad C-terminal de la cadena pesada.

La digestión con la pepsina rompe la molécula del anticuerpo dividiendo la porción C-terminal de los puentes disulfuro. Esta digestión da por resultado el fragmento $F(Ac')_2$ compuesto de dos fragmentos Fac unidos por puentes disulfuro. El resto de la molécula sufre una degradación extensiva.

Regiones V y C

Cada cadena polipeptídica está compuesta por *dominios*, o secuencias de péptidos de tamaño uniforme (100 a 110 residuos de aminoácidos), que contienen enlaces disulfuros entre las cadenas. El dominio del segmento N-terminal o el sitio de combinación con el anticuerpo es más variable en su secuencia de aminoácidos que el resto de la cadena de polipéptidos y se denomina *región variable* (región V). La secuencia y el plegamiento espacial de la cadena del polipéptido son responsables de la especificidad del anticuerpo y la afinidad. El resto de la cadena de polipéptido está compuesto por dominios que son similares en las moléculas de inmunoglobulinas, tanto dentro de misma especie como en diferentes especies. Estos dominios se denominan *regiones constantes* (regiones C). Las cadenas ligeras están compuestas por una región variable y una constante (V_L y C_L). Las cadenas pesadas constan de una región variable y de tres a cuatro regiones constantes (V_H y C_{H1-4}) (ver Fig. 11-2).

Las secuencias específicas de aminoácidos de las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas de una molécula de anticuerpo, le confieren a ésta una estructura tridimensional única en su potencial de unión al antígeno. Estas secuencias se denominan el *idiotipo* de la molécula. El idiotipo está determinado por el determinante antigénico, al cual está dirigido el anticuerpo. La estructura del idiotipo permite el acoplamiento complementario del determinante antigénico al sitio de unión del anticuerpo.

Tipos de cadenas ligeras

Existen dos tipos de cadenas ligeras halladas en las moléculas de inmunoglobulinas, kappa (κ) y lambda (λ). Las cadenas livianas kappa y lambda difieren en la secuencia de aminoácidos de sus regiones constantes. Una molécula de anticuerpo dada contiene siempre dos cadenas livianas kappa idénticas o dos cadenas livianas lambda idénticas. Una molécula de anticuerpo nunca puede tener ambas cadenas livianas, kappa y lambda, juntas. En el suero humano la relación de moléculas de anticuerpos kappa a lambda es de aproximadamente 2:1.

Tipos de cadenas pesadas

Se distinguen cinco tipos de cadenas pesadas en humanos, basados en diferencias estructurales en las regiones constantes de las cadenas. Estas variaciones estructurales permiten diferencias funcionales. Los tipos de cadena pesada son designados como gama (γ), alfa (α), mu (μ), delta (δ), epsilon (ϵ). Los tipos de cadenas pesadas varían en el peso molecular. Las cadenas pesadas gama, alfa y delta están compuestas de tres regiones

constantes. Las cadenas pesadas mu y epsilon tienen cuatro regiones constantes. Los tipos de cadenas pesadas determinan la clase de inmunoglobulina. En el ser humano existen cinco clases de inmunoglobulinas, correspondientes a los cinco tipos de cadena pesada: inmunoglobulina G (IgG), inmunoglobulina A (IgA), inmunoglobulina M (IgM), inmunoglobulina D (IgD) e inmunoglobulina E (IgE) (Tabla 11-1).

Además, algunas clases de inmunoglobulinas poseen subclases basadas en diferencias adicionales de aminoácidos en sus regiones constantes. La IgG tiene cuatro subclases, y la IgA e IgM tienen cada una dos subclases. Las propiedades biológicas y las concentraciones de las subclases pueden diferir.

Inmunoglobulina G

Las moléculas de IgG son monómeros de la subunidad básica de inmunoglobulina. Están compuestas por dos cadenas livianas kappa o lambda y dos cadenas pesadas gamma. Las moléculas de IgG pueden por lo tanto ser representadas como $g_2 l_2$ o $g_2 k_2$. Aproximadamente el 75% de las inmunoglobulinas séricas son IgGs. La frecuencia de las subclases de la IgG varía de la siguiente manera: IgG₁, 60% a 70%; IgG₂, 14% a 20%; IgG₃, 4% a 8%, e IgG₄, 2% a 6%. Existen evidencias que los anticuerpos a ciertos antígenos puedan estar restringidos en sus subclases. Los antígenos polisacáridos tienden a producir los anticuerpos IgG₂ e IgG₄. Los anticuerpos antivirales y antinucleoproteínas se encuentran principalmente en las subclases IgG₁ e IgG₃.

Las moléculas de IgG atraviesan la placenta y son las responsables de la defensa inmunológica del recién nacido. Las moléculas de IgG también se fijan a la superficie de las células efectoras, las que a su vez luego son capaces de mediar reacciones citotóxicas, importantes para la protección del huésped. Las moléculas de IgG unen o “fijan” el complemento, un complejo de proteínas séricas que participan en la lisis o eliminación de partículas extrañas. Las proteínas del complemento se unen a la molécula de IgG en el punto medio de la cadena pesada, cerca del puente disulfuro en el dominio CH₂. Esta área de alta flexibilidad se denomina *región bisagra*. Después de la reacción con antígenos grandes, esta región sufre cambios espaciales para exponer el sitio de unión con el complemento (ver Fig. 11-2). Las moléculas de las subclases de IgG difieren en su capacidad para fijar las proteínas del complemento. La IgG 3 es la más activa, seguida por IgG₁, IgG₂ e IgG₄.

Inmunoglobulina M

La IgM constituye aproximadamente el 10% de las inmunoglobulinas séricas y se presenta fundamentalmente como un pentámero de la estructura básica de la inmunoglobulina. Los cinco monómeros de inmunoglobulinas se sostienen en un círculo mediante puentes disulfuro entre las cadenas H de las subunidades. Además la molécula de IgM contiene una cadena polipeptídica denominada cadena de *unión* o J que ayuda a mantener su estructura. La cadena J es una glicoproteína pequeña (15,000 daltones) que está unida covalentemente a las cadenas H de la molécula.

La IgM es la inmunoglobulina predominante en la respuesta inmune inicial a un antígeno. Es la inmunoglobulina más eficiente en la fijación del complemento. Esta eficiencia se debe a su estructura pentamérica. La presencia de 10 unidades Fac confiere a la molécula pentamérica de la IgM una valencia teórica de 10. Esto significa que una molécula de IgM



debe ser capaz de unirse a 10 moléculas de antígeno simultáneamente. Aunque este valor ha sido calculado en algunos sistemas experimentales, normalmente no se observa. Esta disparidad puede ser debida al impedimento estérico

Inmunoglobulina A

La inmunoglobulina A constituye aproximadamente el 15% de las inmunoglobulinas séricas aunque es la predominante en las secreciones corporales como la saliva, lágrimas, sudor, leche humana, y calostro. En el suero, la IgA existe tanto en la forma monomérica como polimérica. La IgA sérica polimérica posee la cadena J. La IgA secretora existe como un dímero de la unidad básica de inmunoglobulina combinada con una cadena J y una cadena polipeptídica adicional denominada la *porción secretora*. Ésta se encuentra unida a la IgA secretora dimérica por una unión no covalente fuerte. Es importante en el transporte secretor de la molécula y en su protección contra la digestión proteolítica en el intestino. La IgA secretora proporciona la primera línea de defensa contra las infecciones locales y es importante en el procesamiento de los antígenos de alimentos en el tubo digestivo.

Inmunoglobulina D

La IgD es un monómero de la unidad básica de la inmunoglobulina y está presente en el suero humano en cantidades mínimas. Además se expresa en las membranas de la superficie celular del linfocito. La función principal de la IgD es desconocida. Puede estar involucrada en la diferenciación del linfocito.

Inmunoglobulina E

La IgE es también una inmunoglobulina monomérica. Está presente en el suero humano en concentraciones muy bajas. La IgE unida a las células mediante su porción Fc, es responsable de las manifestaciones fisiológicas de la alergia.

Reacciones Antígeno-Anticuerpo

Las reacciones antígeno-anticuerpo fueron primeramente reconocidas por bacteriólogos quienes también conjeturaron que tales reacciones demostraban especificidad. Los bacteriólogos observaron que el suero de pacientes recuperados de las enfermedades infecciosas podía aglutinar al organismo responsable de su enfermedad, pero no a otros organismos no relacionados. Los sueros de personas no expuestas a la enfermedad o de pacientes antes de contraer la enfermedad no podían aglutinar a los mismos organismos. Debido a esto, los científicos propusieron la existencia de moléculas de anticuerpos, la especificidad de sus interacciones con los antígenos, y la importancia de tales interacciones en los mecanismos de defensa del huésped. Las siguientes secciones consideran las fuerzas involucradas en la unión antígeno-anticuerpo, la especificidad, y el mecanismo de reacción.

Fuerzas de unión

La fuerza de unión de un antígeno a un anticuerpo depende de la complementariedad que pueda existir entre el determinante antigénico y el idiotipo del anticuerpo y la atracción

electrostática resultante. También depende de la suma de las fuerzas intermoleculares débiles no covalentes, como los puentes de hidrógeno, las fuerzas de van der Waals, y las interacciones hidrofóbicas (ver Tabla 53-2). Las fuerzas débiles de corto alcance pueden operar entre el antígeno y el anticuerpo si su exactitud de ajuste los acerca suficientemente.

En solución, a pH fisiológico, los grupos polares cargados en los residuos de aminoácidos de las proteínas pueden ser atraídos fuertemente entre sí. Estas fuerzas electrostáticas son las más fuertes y las que contribuyen con más importancia a la atracción no covalente entre el antígeno y el anticuerpo.

Los puentes de hidrógeno entre los grupos carboxilo y amino de los enlaces peptídicos también contribuyen a las fuerzas de atracción. Los puentes de hidrógeno son más débiles que las fuerzas electrostáticas, pero su número los hace un factor importante.

Las fuerzas de van der Waals son las fuerzas participantes más débiles. Éstas pueden funcionar sólo dentro de un radio muy pequeño de acción debido a su escaso poder. A medida que se acerca un determinante antigénico al idiotipo, se inducen fluctuaciones de carga dentro de los átomos de las moléculas. A distancias muy próximas, el núcleo de un átomo puede ser atraído por los electrones de la órbita externa de un segundo átomo. Las fuerzas de van der Waals contribuyen a la fuerza de unión.

El componente final de las fuerzas de atracción incluye interacciones hidrofóbicas entre grupos apolares en solución. El enlace hidrofóbico funciona mediante la exclusión de las moléculas polares del agua para agrupar las moléculas hidrofóbicas. Estas interacciones también sirven para atraer las moléculas polares del agua a los residuos hidrofílicos de aminoácidos en las moléculas proteicas. Las moléculas de anticuerpos tienen cantidades mayores de residuos de aminoácidos hidrofóbicos como alanina, leucina, tirosina, triptofano y metionina en sus sitios de combinación, donde estos incrementan las uniones a los residuos hidrofóbicos en los determinantes antigénicos.

Afinidad del anticuerpo

La fuerza de unión de un determinante antigénico único a un anticuerpo es una función de que tan exacto es el ajuste y se denomina *afinidad del anticuerpo*, que es una expresión de la atracción entre las moléculas del anticuerpo y del antígeno. Es una función de la suma de las fuerzas intermoleculares, no covalentes de corto alcance.

La unión del antígeno al anticuerpo es una reacción reversible. El equilibrio de la reacción favorece la asociación antígeno-anticuerpo si el ajuste entre las moléculas es adecuado y las fuerzas que las unen son relativamente fuertes y estables. La fuerza de asociación entre el antígeno y el anticuerpo está representada por la constante de asociación, la cual puede ser derivada como se muestra a continuación:



$$\frac{[\text{Ag} \cdot \text{Ac}]}{[\text{Ag}] [\text{Ac}]} = K_a \text{ (Constante de asociación)} \quad \text{Ec. 11-2}$$



Para estudiar estas reacciones, se colocan soluciones de un antígeno pequeño o hapteno a cada lado de una membrana semipermeable. A medida que el hapteno difunde a través de la membrana, la reacción procede hacia la derecha de la ecuación 11-1; es decir, el hapteno y el anticuerpo se asocian para formar complejos. Eventualmente se alcanza el equilibrio; en este punto la velocidad de la reacción hacia la derecha y la velocidad de la misma en sentido opuesto son constantes. Una constante de velocidad, k_1 , expresa la tendencia de la reacción de moverse hacia la derecha, o la tendencia asociarse. La otra constante k_2 , expresa la tendencia de la reacción para moverse hacia la izquierda o disociarse. Estas constantes de velocidad de reacción difieren para cada par de antígeno y anticuerpo. Las concentraciones de antígeno, anticuerpo y complejo en equilibrio se describen mediante la ecuación 11-2. La constante de equilibrio, K_a , expresa la tendencia de la reacción para favorecer la asociación entre el antígeno y el anticuerpo.

Heterogeneidad de la respuesta inmune

El análisis de la unión de un hapteno simple con un solo determinante antigénico, muestra la variación en la fuerza de unión de las moléculas de anticuerpos. La inmunización con un solo determinante antigénico produce una variedad de anticuerpos con diferentes sitios de unión del anticuerpo y con un rango de afinidades del anticuerpo. Esto se denomina *heterogeneidad* de la respuesta inmune. Debido a que los haptenos son tridimensionales, el sistema inmune produce anticuerpos que tienen áreas de contacto diferentes (Fig. 11-3). El anticuerpo presenta diversas distribuciones de carga y residuos hidrofóbicos que dan lugar a distintos grados de unión con cada anticuerpo diferente.

Avidez del anticuerpo

En situaciones naturales “in vivo” se generan una variedad de moléculas de anticuerpo en respuesta a un gran número de estímulos antigénicos multivalentes. Por lo tanto, existen dos áreas de complejidad: (1) anticuerpos múltiples generados contra diferentes conformaciones en un solo determinante antigénico (2) múltiples determinantes antigénicos en un solo antígeno natural. Ambos generan la *diversidad* de la respuesta inmune. La medida de la fuerza de unión del anticuerpo con los determinantes antigénicos múltiples en antígenos naturales se denomina *avidéz*. La avidéz es una medida de la estabilidad del complejo antígeno-anticuerpo. Es dependiente en parte de la afinidad de cada anticuerpo por su determinante antigénico complementario. Sin embargo, existe un efecto de aumento de la avidéz con los antígenos multivalentes. La suma de la unión es mayor que sus partes individuales debido a la naturaleza reversible de las uniones antígeno-anticuerpo y a la naturaleza divalente de las moléculas de IgG o a la naturaleza multivalente de las moléculas de IgM. Si la unión única entre el antígeno y el anticuerpo se disocia, el antígeno se escapa. Si un antígeno tiene dos determinantes antigénicos, cada uno de los cuales está unido por anticuerpo, el antígeno se mantiene en su lugar hasta que la unión rota se vuelva a formar. (Fig. 11-4). Por lo tanto la avidéz es una medida de la estabilidad del complejo antígeno multivalente-anticuerpo multivalente.

Reacción cruzada

La reacción cruzada de antígeno y anticuerpo es un coproducto de la heterogeneidad de la respuesta inmune. Como se mencionó antes, la inmunización con un solo hapteno produce una

variedad de anticuerpos de afinidades diferentes. Algunos de estos anticuerpos se combinarán con haptenos químicamente relacionados y cuya estructura es similar. La reactividad de un anticuerpo a un antígeno diferente puede también indicar que los dos antígenos en cuestión comparten un determinante antigénico común previamente desconocido. Por lo tanto la reacción cruzada puede resultar de determinantes antigénicos idénticos o similares presentes en diferentes antígenos. Tal reacción cruzada se observa a menudo con anticuerpos producidos contra medicamentos como la penicilina. La reactividad de un anticuerpo con la penicilina puede ser muy alta, pero los derivados metabólicos conteniendo la estructura básica de la droga pueden reaccionar también con un anticuerpo producido contra el compuesto completo.

En caso de un estímulo antigénico prolongado, como el que ocurre en la infección natural la respuesta inicial es con moléculas de baja especificidad y baja afinidad, que pueden reaccionar con otros antígenos estrechamente relacionados. Con el tiempo, los animales demuestran una selección natural de clones de células plasmáticas productoras de anticuerpos de alta afinidad. A medida que la heterogeneidad de la respuesta del anticuerpo se reduce, la especificidad de las reacciones antígeno-anticuerpo aumenta. Esta adaptación de la respuesta inmune promueve una protección efectiva del huésped contra la infección.

Bases genéticas de la diversidad del anticuerpo

Es conocido que la heterogeneidad de la respuesta inmune o la variedad de los anticuerpos producidos contra un solo antígeno está genéticamente determinada. Las regiones variables (V) de las cadenas ligeras y pesadas de la molécula del anticuerpo codifican la especificidad del anticuerpo. Algunos sitios en la secuencia de aminoácidos de la región V tienen una probabilidad aún mayor de variación de aminoácidos. Estas *regiones hipervariables*, dispersas a lo largo de la secuencia de aminoácidos de la región V, se aproximan entre sí mediante el plegamiento natural (estructura terciaria) de la molécula de anticuerpo. La secuencia de aminoácidos determina la posible atracción entre los residuos de aminoácidos polares, así como también la posibilidad de formar puentes disulfuros entre las cadenas. El acercamiento de regiones hipervariables mediante el plegamiento de la molécula de anticuerpo origina la formación del sitio de combinación del anticuerpo.

Reacciones de Precipitación Antígeno-Anticuerpo

La reacción primaria del antígeno con el anticuerpo se detecta normalmente por las manifestaciones secundarias de la reacción. La naturaleza de las manifestaciones secundarias depende de las condiciones experimentales, la clase del anticuerpo involucrado en la reacción, el número de determinantes antigénicos en el antígeno, y el tamaño y solubilidad del antígeno. La reacción del anticuerpo con moléculas solubles conteniendo determinantes antigénicos múltiples que permiten reacciones cruzadas, se detecta por la *precipitación* del complejo en la solución. El término *floculación* puede utilizarse para describir una reacción de precipitación que produce un precipitado grande, laxamente unido. La reacción de los anticuerpos con antígenos grandes, particulados, multivalentes se detecta por la aglutinación del antígeno. Estas reacciones se analizan por separado.



Curva de precipitación

Cuando una cantidad conocida de anticuerpo está presente en solución en una serie de tubos a los cuales se agregan cantidades crecientes de antígeno, se produce precipitación en algunos de los tubos. Cuando la cantidad de precipitado se mide y se correlaciona con la cantidad de antígeno presente, se obtiene una curva similar a la de la Fig. 11-5.

En la primera fase de la reacción, llamada *zona de exceso de anticuerpo*, no puede detectarse antígeno libre (antígeno que no está unido al anticuerpo) en el fluido y esencialmente no se halla ningún precipitado. Sin embargo, puede detectarse anticuerpo libre (no unido). A medida que se añaden cantidades crecientes de antígeno, la cantidad de precipitado aumenta hasta el punto en que se logra la máxima precipitación. En este punto no se detecta antígeno y anticuerpo libres en el fluido. Esta se denomina *zona de equivalencia*. A medida que la cantidad del antígeno agregado continua aumentando, disminuye la cantidad de precipitado detectado. El examen de la fase líquida de la reacción en este punto muestra la ausencia de anticuerpo libre, pero cantidades crecientes de antígeno libre. Esta área de la curva se denomina *zona de exceso de antígeno*.

Teoría de la red

Los complejos antígeno-anticuerpo precipitan en la solución debido a la naturaleza multivalente de ambas moléculas. La reacción de antígenos con determinantes antigénicos múltiples y anticuerpos con dos (como la IgG) o más (como la IgM) sitios de unión del anticuerpo, produce una red de moléculas entrelazadas. Las moléculas de anticuerpo pueden unirse mediante enlaces transversales a los sitios antigénicos en la misma o en diferentes moléculas del antígeno. A medida que el tamaño y la complejidad de la red aumenta, ésta se vuelve insoluble y precipita en la solución (Fig. 11-6).

En la zona de exceso de anticuerpo, una sola molécula de antígeno se une a cada molécula de anticuerpo. El exceso de anticuerpo asegura que cada molécula de antígeno pueda encontrarse con una molécula de anticuerpo libre. La ausencia del enlace transversal produce complejos solubles pequeños.

A medida que la concentración del antígeno aumenta y se ingresa en la zona de equivalencia, se forman complejos de tamaño creciente con niveles también crecientes de enlaces transversales. Tales redes grandes y complejas precipitan en la solución.

A medida que la concentración de antígeno continua aumentando se alcanza la zona de exceso de antígeno. En esta porción de la curva se vuelven a observar complejos pequeños. El tamaño de la red disminuye debido a que hay suficiente antígeno como para permitir la unión de una molécula de antígeno libre a cada sitio de combinación del anticuerpo. A altas concentraciones de antígeno, la falta de precipitación puede dar lugar a resultados falsos negativos. Obviamente, la detección de antígeno por precipitación de anticuerpo requiere concentraciones óptimas de ambos reactivos. La formación de redes más adecuadas para la precipitación se produce con concentraciones iguales y equivalentes de antígeno y anticuerpo o con un ligero exceso de antígeno.

Otros factores que afectan la precipitación

La precipitación de los complejos antígeno-anticuerpo en la solución puede verse afectada por factores diferentes a la relación de las concentraciones del antígeno y anticuerpo. Moléculas diferentes de anticuerpo pueden precipitar el mismo antígeno en grados variables. La eficiencia

del anticuerpo depende de su afinidad y su especificidad. La carga y la conformación del complejo antígeno-anticuerpo son también importantes. Los complejos muy cargados son difíciles de precipitar. Los mejores precipitados se producen con antígenos proteicos de peso molecular entre 40,000 a 160,000 daltones. Las proteínas en este rango son fácilmente entrelazadas por las moléculas de anticuerpos polivalentes. Los antígenos polisacáridos, las proteínas desnaturalizadas, y los virus producen curvas de precipitación más amplias. Su gran tamaño obstaculiza estéricamente el enlace transversal. La precipitación también puede verse afectada por la temperatura, pH y las concentraciones iónicas. Tales factores influyen en las interacciones antígeno-anticuerpo a nivel molecular.

Reacciones de precipitación en gel

Las reacciones de precipitación se realizan frecuentemente en una matriz con soporte de gel compuesto de agar o el polisacárido más purificado, agarosa. El agar previene la mezcla convectiva del antígeno y el anticuerpo, y por lo tanto asegura la formación de gradientes de concentración de los dos reactivos. La precipitación en agar es una técnica moderadamente sensible cuando se la compara con los más nuevos avances, tal como el radioinmunoensayo, pero es ampliamente utilizada debido a su simplicidad y versatilidad. Además, las reacciones de precipitación en gel pueden modificarse para permitir el estudio de las relaciones antigénicas entre los diferentes compuestos. En las siguientes secciones se discuten dos reacciones de precipitación en gel, la doble difusión y la inmunodifusión radial.

Doble Inmunodifusión.

En las reacciones de doble inmunodifusión, o *técnica de Ouchterlony*, se vierte el agar o agarosa sobre un soporte sólido, como una placa de vidrio o caja de petri. Luego se realizan incisiones en el agar. Las soluciones de antígeno y anticuerpo se introducen en pocillos separados. Las soluciones entonces difunden en el gel, una hacia la otra, de una manera radial durante la incubación a temperatura ambiente (Fig. 11-7). Con la difusión en el agar, las soluciones establecen gradientes de concentración que disminuyen con la distancia desde el pocillo. En el punto de equivalencia del antígeno-anticuerpo, situado en la interfase del frente de difusión, se forma una línea de precipitación (ver Fig. 11-7). La posición y forma de la línea están definidas por la concentración de los reactivos y el tamaño de las moléculas. La línea estará mas cerca del pocillo con el reactivo de menor concentración porque la distancia recorrida es directamente proporcional a la concentración. El grado de difusión es también inversamente proporcional al tamaño molecular. Los compuestos de alto peso molecular, como la IgM, difunden mas lentamente que los compuestos de bajo peso molecular, como la IgG. La línea de precipitación formada en la interfase de los dos gradientes de concentración será cóncava hacia el compuesto de alto peso molecular, cuyo índice de difusión es mas lento. Debido a que la precipitación ocurre en un rango entre el punto equivalencia del antígeno-anticuerpo y un ligero exceso de antígeno, una proporción inapropiada de antígeno a anticuerpo evitará la formación del precipitado.

La presencia de determinantes antigénicos diferentes en la misma o en diferentes moléculas pueden detectarse por la producción de más de una línea de precipitación, sí el antisuero utilizado contiene anticuerpos contra los múltiples antígenos (Fig. 11-8). Dos antígenos en la solución de antígenos crearán dos gradientes de concentración independientes

a medida que difunden en el agar. La precipitación se va a producir en el punto de equivalencia de cada antígeno con su anticuerpo correspondiente. De esta manera se pueden estudiar los componentes de una mezcla de antígenos.

La técnica de Ouchterlony también permite analizar la relación entre dos mezclas antigénicas. La solución de anticuerpo se coloca en un pocillo ubicado en el centro del gel y rodeado de varios pocillos, en los cuales se colocan las soluciones de antígeno. Los antígenos no relacionados que tienen anticuerpos correspondientes en la solución de anticuerpos, formarán líneas de precipitación separadas correspondientes a sus distintos componentes. La difusión radial de los pozos adyacentes causa la superposición de los dos gradientes, pero debido a que los gradientes de concentración de los antígenos son independientes, se forman dos líneas distintas y separadas (Fig. 11-9). La doble espuela formada en la interfase de los dos antígenos es característica de la *reacción de no-identidad*. Los dos antígenos o mezclas de antígenos no tienen nada en común en relación a la solución de anticuerpos utilizados.

Cuando dos soluciones de antígenos idénticos se prueban con sus anticuerpos comunes da como resultado una *reacción de identidad* (Fig. 11-9). Se forman las líneas de precipitación, separadas pero adyacentes, en sus puntos de equivalencia contra el anticuerpo. Debido a que la difusión a través del gel es radial, se forma un área de concentración antigénica común y compartida entre los dos pocillos adyacentes. Por esta razón, existe una fusión de las dos líneas separadas de precipitación. Esta fusión o reacción de identidad indica que las soluciones de antígeno son idénticas con respecto al anticuerpo utilizado o que las soluciones de antígeno tienen un determinante antigénico común. Esto no implica identidad molecular. Incluso, si las concentraciones de los antígenos en los pocillos adyacentes difieren, aún se forma una línea de precipitación común en el punto promedio de concentración de los dos frentes de antígenos.

Una *reacción de identidad parcial* se observa cuando pocillos adyacentes comparten algunos pero no todos los antígenos detectados por la solución del anticuerpo. Una reacción de identidad parcial es una reacción de no-identidad superpuesta a una reacción de identidad (ver Fig. 11-9). Una línea de fusión común se forma por reacción del antígeno compartido. Un segundo punto de equivalencia idéntico entre el nuevo anticuerpo y un antígeno común crean una línea de precipitación superpuesta que se extiende dentro del área común entre los pocillos adyacentes. El segundo antígeno crea un gradiente de concentración al que no contribuye el pocillo contiguo. La espuela indica que la segunda solución de antígeno carece de un determinante antigénico presente en la primera solución de antígeno, que es reconocida por la solución de anticuerpo. La espuela siempre apunta hacia el pozo del antígeno, que es monoespecífico con respecto al anticuerpo.

En la Fig. 11-10 se presentan y comentan dos patrones de doble inmunodifusión que demuestran la relación compleja de las soluciones de antígenos y anticuerpos.

Inmunodifusión radial

La inmunodifusión radial, o *técnica de Mancini*, es una reacción de precipitación llevada a cabo mediante la aplicación de la solución de antígeno a un gel que ha sido previamente impregnado con una solución de anticuerpo monoespecífico. Es una adaptación a la reacción de precipitación en gel que permite cuantificar el antígeno. La solución del anticuerpo contenido en el gel es aplicada a un soporte sólido. Posteriormente se cortan los pocillos en el agar, y se colocan diluciones del antígeno en los mismos. Los antígenos difunden radialmente



en el agar. Esta difusión produce un gradiente de concentración que es inversamente proporcional a la distancia difundida desde el pozo. La concentración de anticuerpo dentro del gel es constante. En el punto donde las concentraciones de antígenos y anticuerpos son equivalentes, se produce la precipitación. Debido a que la difusión desde el pozo es radial, la precipitación aparece como un anillo alrededor del pozo. La reacción de precipitación no es estática sino dinámica. El anillo de precipitación primero se forma cerca del pocillo en el punto inicial de equivalencia del antígeno-anticuerpo. Mientras el antígeno continua difundiendo desde el pozo, un exceso en el antígeno causa una conversión del precipitado a un complejo soluble que se vuelve a disolver y continua difundiendo hacia fuera. Se forma un nuevo anillo en un punto de equivalencia de antígeno-anticuerpo diferente. El cuadrado del diámetro del anillo (mm^2) es directamente proporcional a la concentración del antígeno. El ancho del anillo es una función de la concentración final de los complejos de antígeno-anticuerpo en el punto de equivalencia (Fig. 11-11).

Se puede determinar la concentración de un antígeno desconocido con un volumen constante de muestra, temperatura, pH, tiempo de incubación y concentración de anticuerpo. Esto se obtiene cuando se compara el cuadrado del diámetro del anillo de precipitación de la muestra desconocida con los obtenidos por distintas diluciones de la solución estándar de antígeno. La concentración del antígeno desconocido, se determina fácilmente cuando se dibujan las concentraciones del estándar diluido contra el área del anillo correspondiente.

Bibliografía

Gosling JP: A decade of development in immunoassay methodology, *Clin Chem* 36(8):1408-1427, 1990.
Roitt IM, Brostoff J, Male DK: *Immunology*, St. Louis, 1985, Mosby.
Butt WR, editor: *Practical immunoassay*, New York, 1984, Marcel Dekker.
Keren DF: *High resolution electrophoresis and immunofixation*, ed 2, Boston, 1994, Butterworth.
Weir DM et al, editors: *Immunochemistry*, ed 4, Oxford, England, 1986, Blackwell Scientific Publications.

Tablas

Tabla 11-1. Propiedades de las diferentes clases de inmunoglobulinas humanas

Propiedades	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
Cadena H	γ	α	μ	δ	ϵ
Subclases	1-4	1 y 2	1 y 2	Ninguna	Ninguna
Cadena L	κ y λ	κ y λ	κ y λ	κ y λ	κ y λ
Forma	Monómero	Monómero y dímero	Pentámero (puede circular algún monómero)	Monómero	Monómero
Fórmula	$\gamma_2 \kappa_2$ o $\gamma_2 \lambda_2$	$\alpha_2 \kappa_2$ o $\alpha_2 \lambda_2$	$\mu_{10} \kappa_{10}$ o $\mu_{10} \lambda_{10}$	$\delta_2 \kappa_2$ o $\delta_2 \lambda_2$	$\epsilon_2 \kappa_2$

Cadena J	No	En dímero	En pentámero	No	No
Peso molecular (aproximado)	150.000	Monómero 160.000 Dímero 400.000	900.000	180.000	190.000
Fijación de complemento (vía clásica)	$G_3 > G_1 > G_2$	No	M_1 y M_2	No	No
Atraviesa placenta	Sí	No	No	No	No
Concentración en suero	8-16 mg/ml	1,4-3,5 mg/ml	0,5-2 mg/ml	0-0,14 mg/ml	≤ 30

Figuras

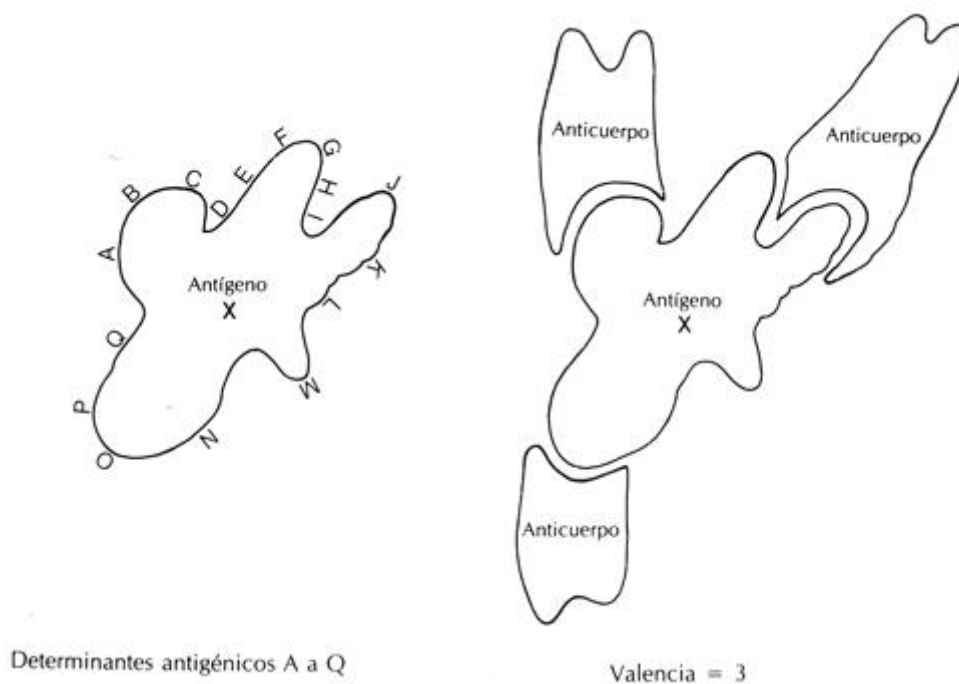


Figura 11-1 El antígeno X contiene muchos determinantes antigénicos diferentes designados desde A hasta Q en la representación esquemática. Cuando las moléculas de anticuerpo se combinan con el antígeno X se unen a sitios diferentes. El número máximo de moléculas de anticuerpos que se han unido en esta figura es de 3; por lo tanto su valencia es 3.

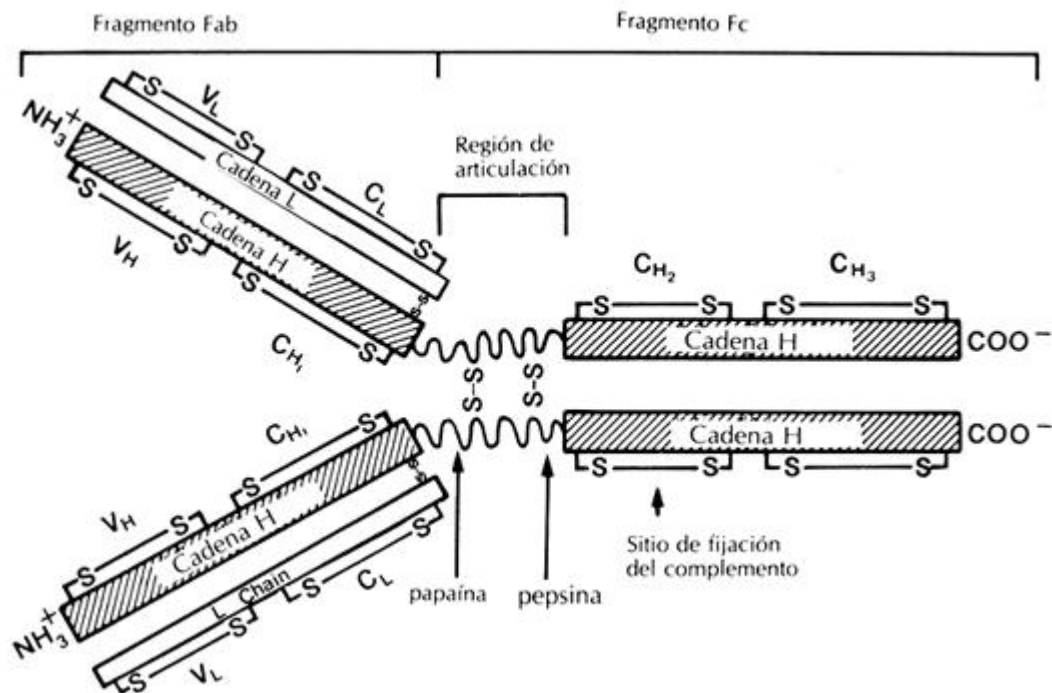


Figura 11-2 Diagrama de la molécula de IgG (monómero de inmunoglobulina). *H*, Cadena pesada; *L*, cadena ligera; *V*, región variable; *C*, región constante; *S—S*, puentes disulfuro. Flechas, sitios de la degradación con papaína y pepsina. NH_3^+ indica N-terminal, COO^- indica C-terminal de la inmunoglobulina

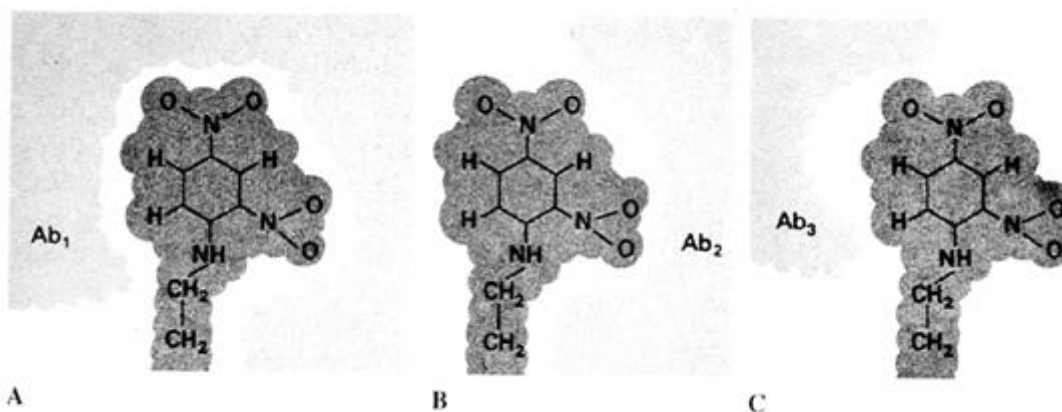


Figura 11-3 Unión de anticuerpos presentes en el mismo antisuero con diferentes afinidades al mismo hapteno (dinitrobenzene ligado al grupo amino de la lisina). A, el anticuerpo₁ se ajusta casi con todo el hapteno y es por tanto de alta afinidad. B, El

anticuerpo₂ tiene menos exactitud para ensamblarse, logrando menos cercanía y tiene una afinidad de unión moderada, mientras que en C, el anticuerpo₃ de baja afinidad, es complementario en su forma sobre tan escasa superficie del hapteno que su energía de unión apenas está por encima de la que ocurre entre proteínas no relacionadas. Se muestra sólo una porción del sitio de unión del anticuerpo. (De: Roitt I: *Essential immunology*, ed 4, Oxford, England, 1980, Blackwell Scientific Publications).

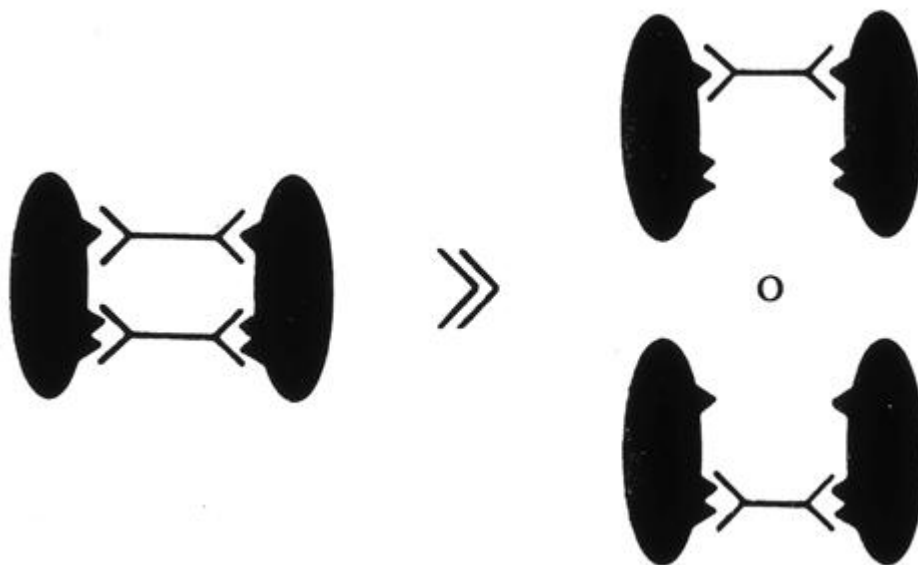


Figura 11-4 La unión multivalente de antígeno-anticuerpo aumenta la fuerza de unión. Un solo enlace creado por moléculas de anticuerpos divalentes entre un solo determinante antigénico en dos antígenos adyacentes es mas débil que la unión creada por dos anticuerpos divalentes unidos simultáneamente a dos determinantes antigénicos únicos en dos antígenos adyacentes. La fuerza y complejidad de esta unión multivalente se define con el término **avidez**.

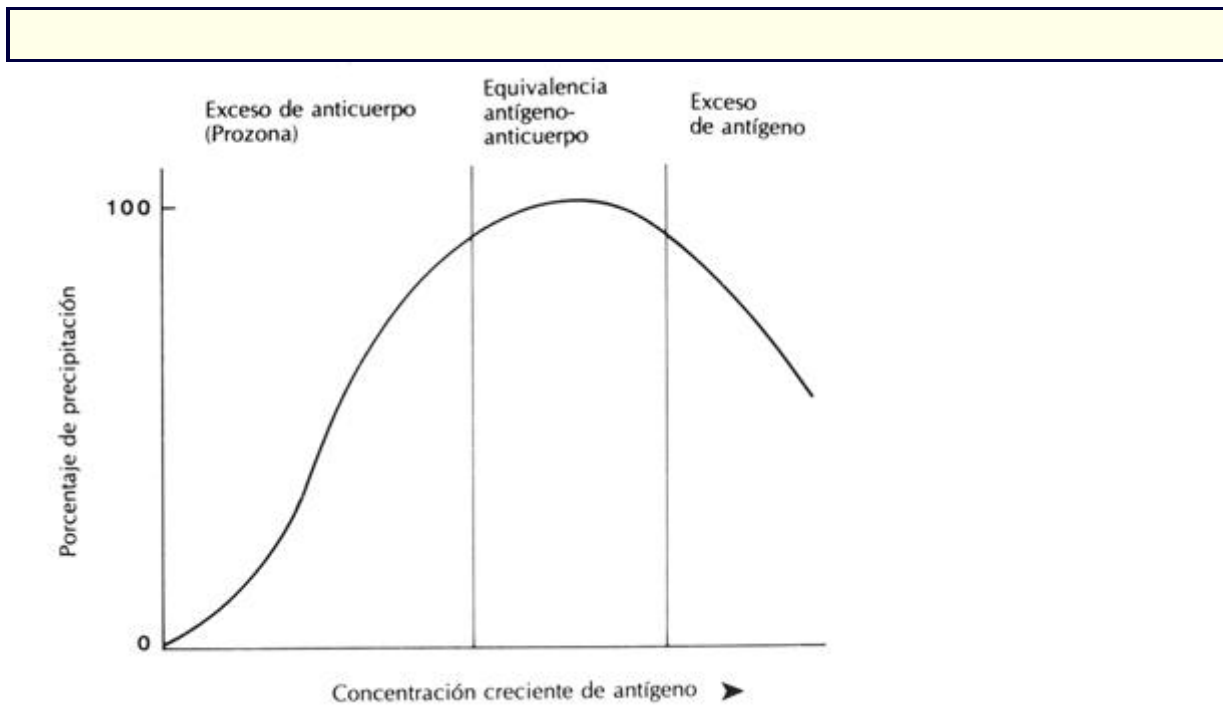


Figura 11-5 Curva cuantitativa de precipitina en que la cantidad del complejo anticuerpo-antígeno que precipita se grafica como una función de la concentración del antígeno.

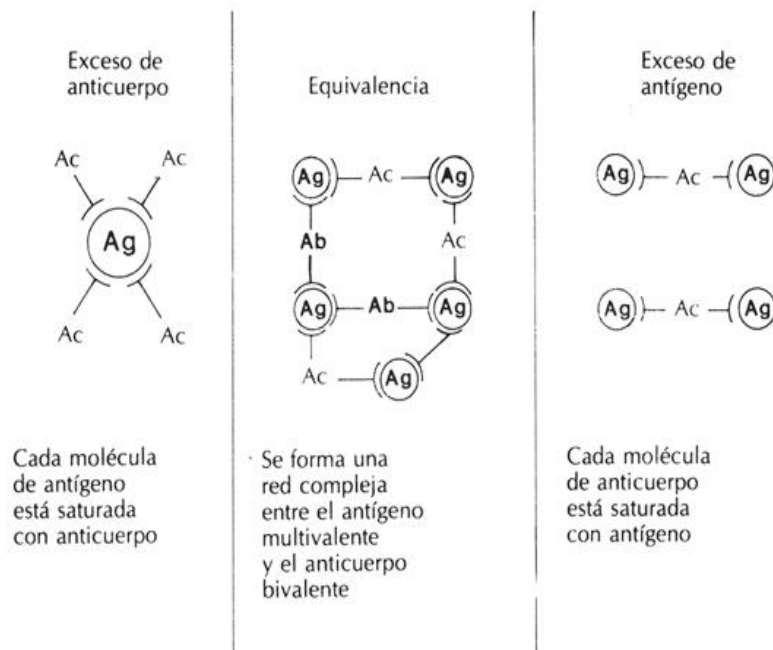


Figura 11-6 Representación del tamaño de los complejos moleculares formados en

proporciones variables entre antígeno y anticuerpo.

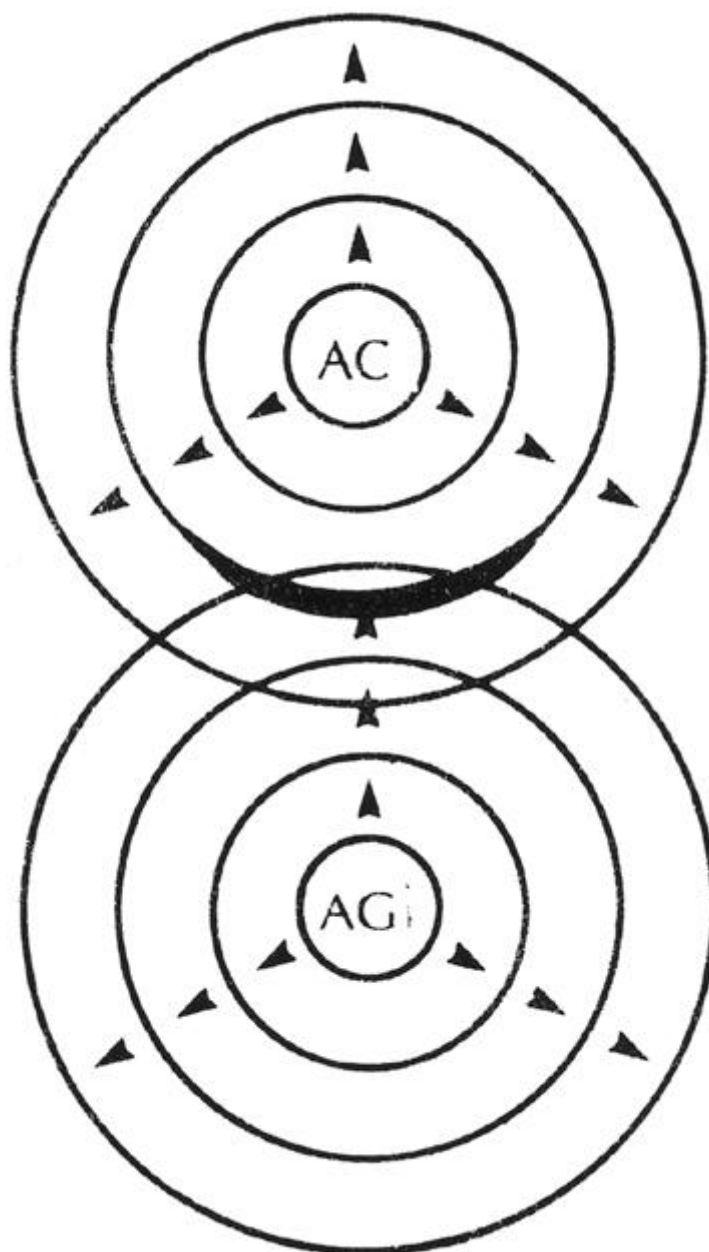


Figura 11-7 Descripción de los gradientes proteicos en la inmunodifusión radial de Ouchterlony. Los círculos concéntricos representan las concentraciones decrecientes de proteínas. Ambos, antígeno (Ag) y anticuerpo (Ac) difunden radialmente desde los pocillos de aplicación. Se produce una precipitación en forma de arco, *arco remarcado en negro*, en el punto de equivalencia antígeno-anticuerpo. La línea de precipitación

está más próxima al inóculo cuando la concentración es baja, y su forma es cóncava si el reactivo posee un peso molecular elevado.

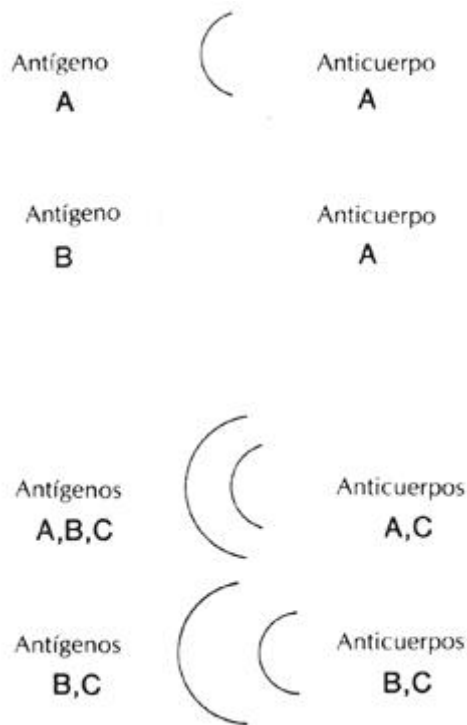


Figura 11-8 Se produce una precipitación en el punto de equivalencia del antígeno con su anticuerpo correspondiente. Se pueden ver múltiples líneas de precipitación de antígenos múltiples y los correspondientes anticuerpos múltiples.

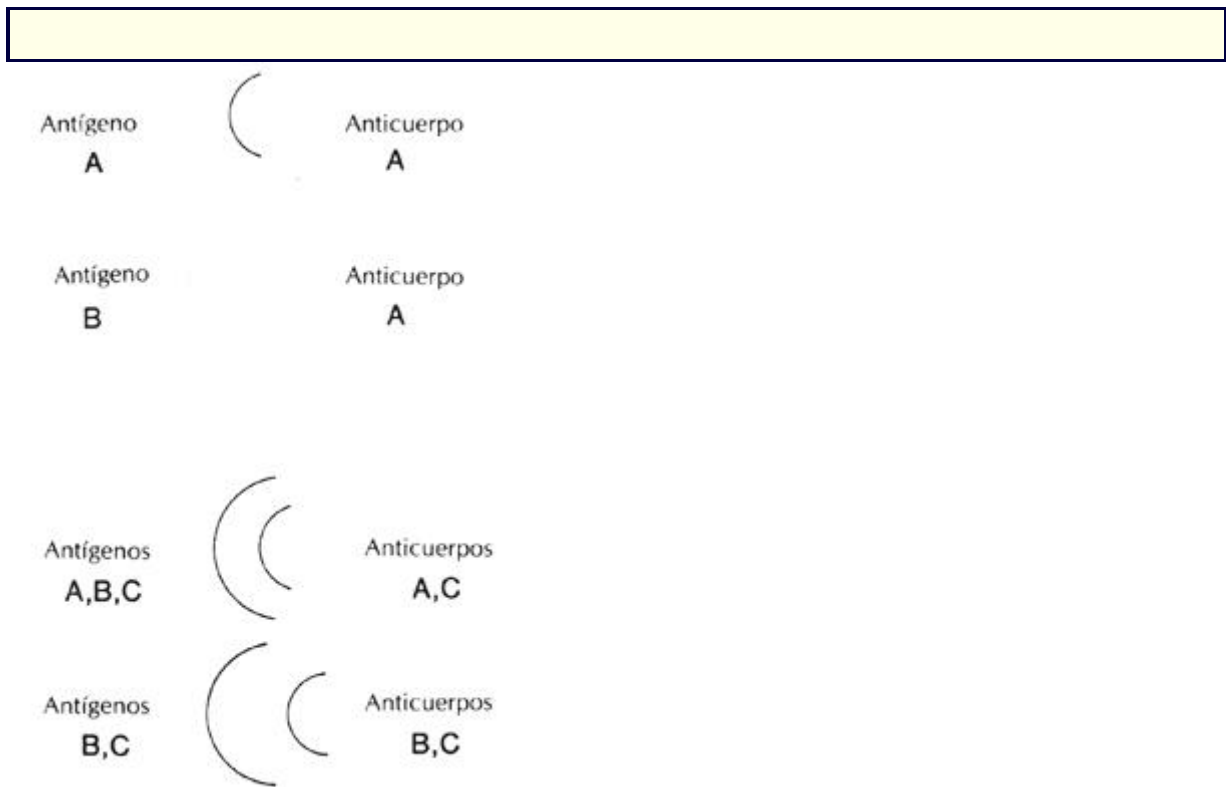


Figura 11-9 Patrones de doble inmunodifusión, Ag, antígeno; Ac, anticuerpo; *línea densa*, línea de precipitación; *círculos*, pocillos de aplicación.

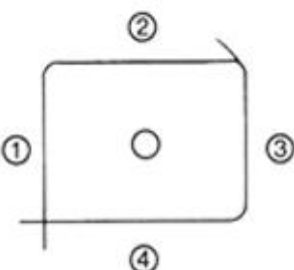
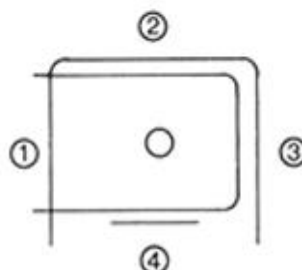
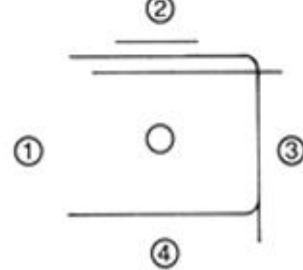
Contenido de la concavidad	Contenido de la concavidad	Contenido de la concavidad
1. Antígeno A	1. Antígeno A	1. Desconocido
2. Desconocido	2. Desconocido	2. Desconocido
3. Desconocido	3. Antígeno B + desconocido	3. Antígeno A + desconocido
4. Antígeno B	4. Desconocido	4. Antígeno B
		
Conclusiones Nº 2 = antígeno A Nº 3 = antígeno A y antígeno B	Conclusiones Nº 2 = antígeno A + antígeno B Nº 3 = antígeno A + antígeno B Nº 4 = antígeno B + antígeno C	Conclusiones Nº 1 = No contiene antígenos reconocidos por los antisueros o las concentraciones de los reactivos no son correctas Los antígenos A y B son idénticos Nº 2 = Contiene antígeno A más antígenos C y D Nº 3 = Contiene A y E

Figura 11-10 Interpretación de los patrones de doble inmunodifusión. El centro de los pocillos contiene un antisuero contra posibles antígenos. Los pocillos circundantes poseen los antígenos de prueba. Líneas densas, reacción de precipitación.

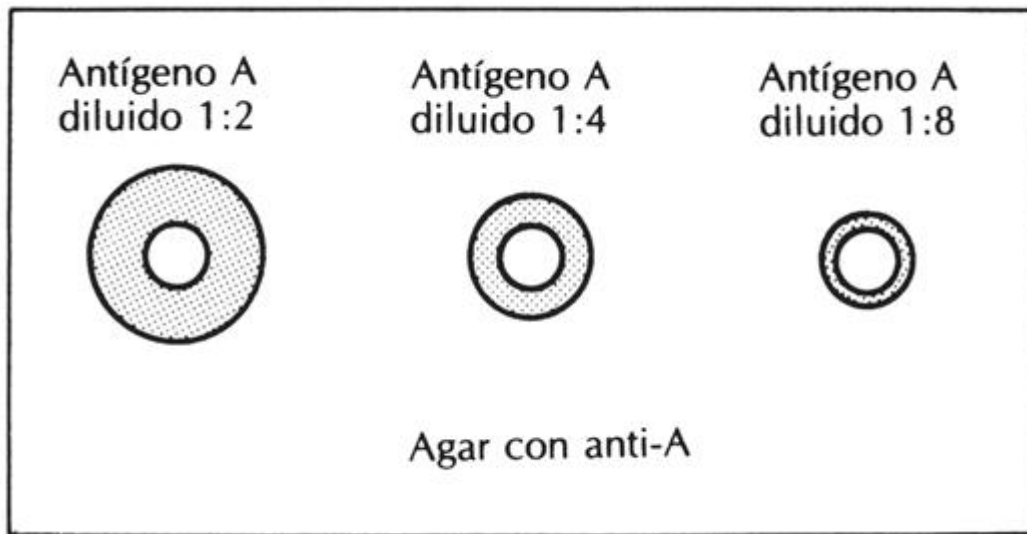


Figura 11-11 Patrones de Inmunodifusión radial. La banda de precipitación, zona sombreada, se extiende como un disco desde el centro de cada pocillo. La zona de precipitación es proporcional a la precipitación.

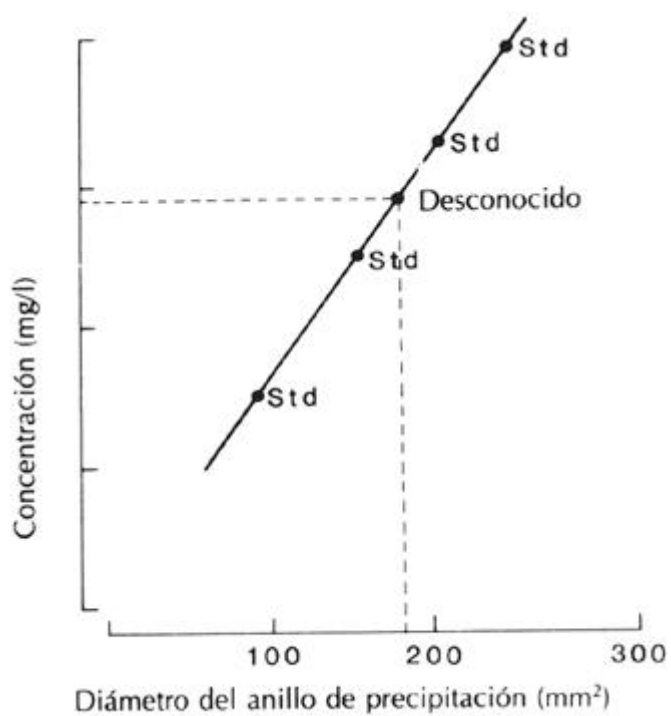


Figura 11-12 Gráfica de concentración del antígeno expresado en miligramos por litro contra el cuadrado del diámetro del anillo de precipitación. Std, estándar.



CAPÍTULO 12

12. Técnicas Inmunoquímicas

Carolyn S. Feldkamp

Reactivos

Anticuerpo como reactivo

Antígeno como compuesto analizado

Inmunodifusión (Ouchterlony)

Principios

Requisitos y preparación de la muestra

Reactivos

Problema común

Interpretación de los resultados

Limitaciones

Inmunoelectroforesis

Principios

Requisitos y preparación de la muestra

Reactivos

Instrumental

Problemas comunes

Interpretación de resultados

Contrainmunoelectroforesis

Inmunofijación (transferencia Western)

Principios

Reactivos

Problemas comunes

Sensibilidad de la prueba e interpretación de resultados

Inmunoelectroforesis bidimensional

Principios

Inmunodifusión radial

Principios

Requisitos y preparación de la muestra

Reactivos

Problemas comunes

Sensibilidad de la prueba



Inmunoelectroforesis Laurell ("cohete")

Principios

Requisitos y preparación de la muestra

Problemas comunes

Sensibilidad de la prueba y coeficiente de variación

Inmunonefelometría

Nefelometría

Problemas comunes

Inmunoensayo de inhibición nefelométrica (IEIN)

Modificaciones adicionales del ensayo

Ensayos de aglutinación

Principios

Factores que influyen en la reacción de aglutinación

Aglutinación directa

Aglutinación indirecta

Inhibición de la aglutinación

Prueba de antiglobulina

Requisitos de la muestra

Reactivos

Equipo de laboratorio

Problemas comunes

Limitaciones

Ensayos de fijación de complemento

Proteínas del complemento

Prueba de una etapa

Prueba de dos etapas

Requisitos y preparación de la muestra

Reactivos

Limitaciones

Inmunoensayos marcados por indicador

Ensayos inmunométricos

Principios

Requisitos y preparación de la muestra

Reactivos

Equipo de laboratorio

Sustancias interferentes

Problemas comunes

Sensibilidad de la prueba y precisión

Resumen

OBJETIVOS



- Establecer el principio de la reacción inmune para cada una de las técnicas que se presentan a continuación, describir los requisitos y preparación de la muestra, enumerar los problemas comunes y explicar la interpretación de los resultados:
 - Inmunoelectroforesis
 - Contrainmunoelectroforesis
 - Inmunoelectroforesis bidimensional
 - Inmunoelectroforesis Laurell (cohete)
 - Inmunonefelometría
 - Transferencia Western
- Establecer los requisitos y preparación de la muestra y enumerar los problemas comunes para el Ouchterlony y las técnicas de inmunodifusión radial.
- Definir la aglutinación y diferenciar entre las reacciones de aglutinación directa, aglutinación indirecta y reacciones de inhibición de aglutinación.
- Describir los principios de los ensayos sandwich de fase sólida, distinguiendo entre aquellos que miden el antígeno y aquellos que miden el anticuerpo.
- Enumerar las marcas usadas para los ensayos de sandwich, comparando su sensibilidad y su capacidad para usarse en los ensayos heterogéneos y homogéneos.

Términos clave

aglutinación Agrupación o agregación mediada por anticuerpos específicos de partículas, como los eritrocitos o las cuentas de látex, a las que se une el determinante antigénico específico.

aglutinina Anticuerpo específico que produce aglutinación.

anti-anticuerpo Un anticuerpo con especificidad para las inmunoglobulinas.

absorción del anticuerpo El proceso de remover o unir un anticuerpo específico no deseado, presente en un reactivo del antisuero, al permitir que reaccione con antígenos no específicos antes de usarlo como reactivo.

reactivo anticuerpo Un anticuerpo de la clase IgG con alto título y alta afinidad, preparado en animales para usarse en los inmunoensayos.

reactivo antígeno Una solución estabilizada que contiene una cantidad conocida de un antígeno que se usa como un estándar.

aglutinina fría Una aglutinina que reacciona mejor a temperaturas menores que la temperatura corporal; usualmente funciona mejor a 4° C.

complemento Un grupo de proteínas séricas activadas como resultado de una reacción antígeno-anticuerpo. Cuando la reacción ocurre en la superficie de un eritrocito, el complemento activado puede lisar la célula.

fijación del complemento Un término aplicado a un conjunto de ensayos en los que el complemento es activado o "fijado" por un sistema de reacción de la prueba.

prueba de Coombs Un tipo de reacción de aglutinación. Una prueba directa de Coombs determina la presencia de anticuerpo en las células; una prueba indirecta mide su presencia en el suero.

contrainmunoelectroforesis Un ensayo en el cual el antígeno y el anticuerpo migran hacia sí mismos bajo la influencia de un campo eléctrico. La presencia del antígeno se observa

mediante la formación de una línea de precipitina.

crioglobulina Proteína que precipita a temperaturas menores que la temperatura corporal; la máxima precipitación ocurre a 4° C.

fluoroinmunoensayo Cualquier procedimiento inmunológico que utiliza una molécula fluorescente como la marca indicadora.

hemolisina Anticuerpo contra eritrocitos ovinos.

inmunoensayo heterogéneo Cualquier técnica que usa dos fases, generalmente líquida y sólida, para separar los componentes que reaccionaron de los que no reaccionaron.

inmovilización La fijación del antígeno o del anticuerpo sobre un medio o soporte sólido como un tubo de plástico o una placa de microvaloración.

inmunodifusión Movimiento aleatorio de propagación del anticuerpo, del antígeno o de ambos en un medio de soporte.

inmunolectroforesis Una técnica de inmunoprecipitación en la cual los antígenos se separan mediante la migración en un campo eléctrico, seguidos de la reacción con anticuerpo por inmunodifusión.

fase indicadora La porción de una reacción inmunoquímica que puede medirse.

ensayo inhibición Un término para aquellos tipos de inmunoensayos en los cuales un exceso de antígenos previene o inhibe la finalización de la fase indicadora inicial o de la fase indicadora de la reacción.

anticuerpo monoclonal Un anticuerpo monoespecífico que es producido por una sola célula plasmática o una clona única de células plasmáticas de un híbrido de mieloma de linfocitos.

monoespecífico Un anticuerpo que reaccionará con un solo tipo de moléculas de antígeno.

ensayo nefelométrico Medición del antígeno o anticuerpo mediante la determinación de la cantidad de luz dispersada como resultado de la cantidad o la velocidad de agregación del complejo antígeno-anticuerpo.

ensayo de inhibición nefelométrica (IEIN). Medición de haptenos mediante la inhibición de la formación de una red del antígeno-anticuerpo.

nefelometría Medición de las propiedades de dispersión de luz de partículas grandes (como complejos antígeno-anticuerpo) en la solución.

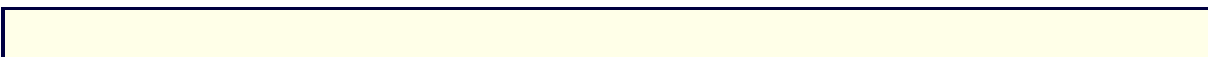
difusión de doble Ouchterlony Una versión de la técnica original de difusión en gel inventada por Oudin en que el antígeno y anticuerpo situados en pozos separados se dejan propagar (por difusión) hacia sí mismos.

anticuerpo policlonal Anticuerpos heterogéneos con afinidades diversas producidas por un gran número de células de plasma.

fenómeno de prozona Reactividad aparentemente baja o ausencia de reactividad causada por un exceso relativo de antígeno. Puede observarse cuando la solución de anticuerpos se usa a concentraciones bajas.

inmunodifusión radial (técnica de Mancini) Medición de la concentración de antígeno al permitir la propagación del antígeno (mediante difusión) en agarosa conteniendo el anticuerpo monoespecífico deseado. El área del anillo de inmunoprecipitina es proporcional a la concentración del antígeno.

inmunolectroforesis de cohete (Laurell) Sistema de ensayos en qué el antígeno, bajo la influencia de un campo eléctrico, migra en agarosa conteniendo el anticuerpo, dando lugar a una reacción de inmunoprecipitación. Las líneas de precipitina tienen forma de cohete.



Tambié se le conoce ampliamente por su abreviatura inglesa "Rocket".

ensayo de "sandwich" Término aplicado a un inmunoensayo de fase sólida en el cual la primera capa es el anticuerpo inmovilizado, la segunda es el antígeno y la tercera es el anticuerpo marcado.

especificidad Propiedad de una molécula del anticuerpo que restringe su reactividad a una molécula o a un grupo definido de moléculas.

título Dilución máxima de un anticuerpo específico que da una reacción cuantificable con un antígeno específico; generalmente se expresa como el recíproco de dicha dilución.

El capítulo 11 describe la naturaleza molecular de los antígenos y los anticuerpos así como las características generales de la reacción antígeno-anticuerpo. Este capítulo cubre varias técnicas que utilizan la reacción antígeno-anticuerpo como la base para detectar, caracterizar o cuantificar constituyentes sanguíneos y otros fluidos corporales que se someten a análisis de laboratorio. Estos constituyentes pueden variar desde los fármacos de bajo peso molecular y sus metabolitos hasta proteínas de alto peso molecular, como la IgM y la alfa₂-macroglobulina. La muestra del paciente contiene, con mayor frecuencia, el antígeno (compuesto analizado) y el anticuerpo se agrega como el reactivo para detectar o medir dicho antígeno. En contraste, en los casos de enfermedad infecciosa, determinaciones serológicas, y las pruebas de anticuerpos autoinmunes, la muestra del paciente es la fuente de anticuerpo y es la medición de anticuerpos la que es clínicamente importante. Para estas determinaciones, se usa un antígeno de composición conocida. El antígeno puede ser soluble o encontrarse asociado al tejido. Sin embargo, esta última forma de prueba se realiza generalmente en la sección de inmunología del laboratorio. Dado que este capítulo trata principalmente las técnicas usadas en el laboratorio de química clínica, consecuentemente nos concentraremos en los procedimientos que detectan el antígeno en la muestra del paciente.

Reactivos

Anticuerpo como reactivo

Los anticuerpos como reactivo se preparan generalmente en los animales, como los conejos o los caprinos, mediante la exposición repetida del animal a las sustancias extrañas. Un grupo de células se estimula para generar una respuesta que produce anticuerpos. Algunos de los grupos de átomos del material inmunizante son los determinantes principales de la molécula de antígeno y causan la producción de la mayor cantidad de anticuerpos; los determinantes menores, sin embargo, también estimulan la producción de anticuerpos. Ya que hay muchos anticuerpos diferentes que son atribuibles a la expansión de varias clonas de células productoras de anticuerpos, el antisero producido es por lo tanto un antisero reactivo *policlonal*. Por ejemplo, un antisero contra la proteína albúmina sérica humana (anti-ASH) es un reactivo que tiene múltiples anticuerpos contra los determinantes antigénicos o configuraciones moleculares específicas que son características y específicas para la superficie de la ASH.

Es importante demostrar que este antisero anti-ASH no reaccionará con otras proteínas séricas, como la IgG y la transferrina. Si este anti-ASH se va a usar como un reactivo en el laboratorio clínico, debe comprobarse su especificidad (o sea, su reactividad con ASH únicamente) en el mismo sistema de prueba inmunológico usado para generar los resultados



del paciente. Para cada reactivo anticuerpo, la especificidad de su reactividad inmunoquímica es el factor simple más importante en el éxito o el fracaso de cualquier técnica inmunológica usada en el laboratorio clínico.

Los anticuerpos monoclonales son generados por una tecnología que genera híbridos a partir de una sola célula productora de anticuerpos (célula de plasma) con una línea celular inmortal. Después de seleccionar uno entre varios cientos de estos híbridos, la línea celular resultante produce un anticuerpo único. Estos anticuerpos tienen una estructura primaria única homogénea y se llaman *anticuerpos monoclonales*. Estos anticuerpos proporcionan un reactivo reproducible de especificidad y afinidad conocida. Los anticuerpos monoclonales se usan en los ensayos de unión competitiva y en los ensayos tisulares para identificar antígenos específicos. La Fig. 12-1 es un esquema que ilustra como se producen los anticuerpos monoclonales.

La selección del anticuerpo como un reactivo en un procedimiento inmunológico que requiere información acerca de sus características, como su fuerza (título), afinidad, y especificidad. Dado que no toda la inmunoglobulina en el antisuero es reactiva, la cantidad de anticuerpo que está disponible para reaccionar en un método inmunológico específico se denomina el "título del anticuerpo". El título es el recíproco de la máxima dilución del anticuerpo que da una reacción cuantificable en un método específico. El título del reactivo anticuerpo es a menudo diferente para cada tipo de procedimiento inmunológico. Por ejemplo, la anti-ASH puede reaccionar en una técnica de inmunoprecipitación a una máxima dilución de 1:32, pero el mismo antisuero puede reaccionar a una máxima dilución de 1:6400 en un procedimiento radioinmunológico. Ocasionalmente la cantidad de reactivo anticuerpo presente puede expresarse en peso, o sea, en miligramos por mililitro. Esta expresión de cantidad del anticuerpo es determinada por técnicas de precipitación y es a menudo útil para determinar la cantidad de reactivo necesario. Para los anticuerpos monoclonales que son prácticamente puros, la cantidad indicada describe las proteínas reactivas totales.

Afinidad.

Los reactivos anticuerpos se clasifican en general en dos categorías, los de alta afinidad y los de baja afinidad. Los anticuerpos en el reactivo pueden ser una mezcla de ambos, pero uno debe usar los reactivos en que los anticuerpos de alta afinidad son predominantes. Esto dará como resultado una unión fuerte con el antígeno que no es reversible fácilmente y que no será afectada sustancialmente por la modificación de las condiciones de reacción. Los anticuerpos de baja afinidad no se unen bien con el antígeno y su comportamiento puede ser alterado por la temperatura, el pH, y la fuerza iónica con cambios consiguientes en la reacción, dando lugar a la disociación del complejo antígeno-anticuerpo. La mayoría de los reactivos anticuerpos comerciales son del tipo de alta afinidad. Sin embargo, si uno prepara los reactivos, éstos deben probarse para asegurarse que son de la afinidad apropiada y preferentemente alta.

Especificidad.

La especificidad se refiere a la capacidad del anticuerpo para restringir su reacción a un grupo definido de moléculas. Dado que estos reactivos son realmente una colección de anticuerpos, éstos están dirigidos a múltiples determinantes antígenicos de un antígeno único y por lo tanto podrían tener reactividades múltiples. En algunos casos, otros reactivos



anticuerpos pueden reaccionar con determinantes antigénicos que son comunes a varias formas moleculares de proteínas plasmáticas. Por ejemplo, un reactivo dirigido contra la molécula de IgG debe reconocer solo la molécula de IgG, pero puede haber un anticuerpo en el reactivo que también reaccionaría con cadenas ligeras de esa molécula de IgG. En virtud que las cadenas ligeras son comunes a todas las clases de inmunoglobulinas (o sea, IgA, IgM e IgD) el reactivo anticuerpo reaccionaría entonces con todas las moléculas de inmunoglobulinas. No sería apropiado decir que estaba reconociendo solo la molécula de IgG. El problema de la reactividad cruzada con otras proteínas séricas generalmente puede ser controlado por una técnica denominada la *absorción de anticuerpos*, que une o remueve del reactivo a la población de anticuerpos que reaccionan inapropiadamente con otras moléculas de la solución de prueba. La absorción es necesaria para prácticamente todos los reactivos anticuerpos del tipo policlonal. A menudo se realiza mediante la adición del antígeno reactivo no deseado o mediante la preparación de anticuerpo puro por columnas de afinidad.

La especificidad del reactivo anticuerpo es sumamente importante en los inmunoensayos enzimáticos y los radioinmunoensayos que se usan con frecuencia para medir la presencia de moléculas pequeñas como los medicamentos y las hormonas. Sin embargo, a menudo hay una reacción residual entre el reactivo anticuerpo y un compuesto estrechamente relacionado. Esta reacción entre el anticuerpo y el antígeno no deseado se denomina *reactividad cruzada*.

Hay ocasiones, sin embargo, que la reactividad cruzada con determinantes antigénicos muy similares no puede evitarse. Por ejemplo, el anticuerpo dirigido contra la molécula pequeña de trinitrofenol reaccionará de manera cruzada con dinitrofenol. Para el anticuerpo, estas entidades de bajo peso molecular parecen muy similares. La única manera de establecer la especificidad del anticuerpo es determinar la afinidad relativa del reactivo anticuerpo contra las presuntas moléculas que están dando reacción cruzada a las concentraciones que probablemente ocurren en los pacientes. A menudo, particularmente en el caso de los reactivos anticuerpos usados en el monitoreo de medicamentos terapéuticos, el grado de reactividad cruzada con los metabolitos del medicamento y con otros medicamentos está indicado por el fabricante.

En virtud de que el reactivo anticuerpo es una proteína, se deben tener todas las precauciones para prevenir su desnaturalización y degradación. El reactivo debe mantenerse libre de contaminación bacteriana y debe almacenarse en el refrigerador (4° C) si se va a usar dentro de un lapso de varios días. Generalmente el almacenamiento adecuado a largo plazo es a -20° C.

Antígeno como compuesto analizado

Numerosas moléculas que ocurren naturalmente o antígenos que son de naturaleza proteica, glicoproteica o lipoproteica pueden detectarse y medirse fácilmente en los fluidos biológicos si los reactivos anticuerpos específicos están disponibles. Además, pueden medirse muchas moléculas pequeñas, como los medicamentos y las hormonas. En el siguiente cuadro se enumeran los ejemplos de las moléculas grandes y pequeñas que son medidas con frecuencia por técnicas inmunológicas. Para asegurar la detección exacta y una cuantificación precisa de estas moléculas usando técnicas inmunológicas, el analista debe prestar extrema atención al manejo y almacenamiento adecuado de los fluidos biológicos que contienen estos antígenos.

Los fluidos biológicos más comúnmente disponibles en el laboratorio para el análisis son el

suelo, la orina y el líquido cefalorraquídeo. Los antígenos presentes en cada uno de estos fluidos están sujetos a la degradación dependiendo de (1) la naturaleza del antígeno, (2) concentración, (3) sensibilidad a diversas enzimas en los fluidos corporales, y (4) relativa estabilidad a diversas temperaturas de almacenamiento (como temperatura ambiente, 4° C, -20° C y -70° C). Cada espécimen debe almacenarse y manejarse adecuadamente para asegurar que la molécula de antígeno no sea alterada y el reactivo anticuerpo pueda reaccionar con los determinantes antigénicos apropiados de la molécula. La estabilidad de los antígenos debe establecerse para cada fluido biológico. Por ejemplo, el componente C4 de complemento de suero es estable y puede medirse con exactitud hasta una semana después de recibir el suero, siempre y cuando el espécimen se almacene a 4° C antes del análisis. Sin embargo, el componente C4 del líquido cefalorraquídeo es muy lábil y está generalmente presente a concentraciones muy bajas. Si este tipo de muestras se almacena más de 8 horas a 4° C antes del análisis, C4 se habrá degradado y será no cuantificable. Por lo tanto el líquido cefalorraquídeo debe estar congelado y almacenado a -70° C para asegurar que C4 no se degrade antes de la medición. Otro ejemplo es el de la desnaturalización de antígeno en los especímenes de orina. Dado que la mayoría de los especímenes de orina son ácidos, la medición inmunológica de diversas proteínas es a menudo poco confiable. Las proteínas se degradan a un pH ácido, y se pierden muchos determinantes antigénicos de estas proteínas. La Beta₂-microglobulina es una proteína que se encuentra tanto en la orina como en el plasma. En la orina se usa para evaluar la disfunción tubular renal. Esta proteína se destruye rápidamente si el pH de la orina es menor de 6.0. La cuantificación de proteínas específicas en las muestras de orina requiere la neutralización inmediata del pH ácido en el momento de la recolección. Por contraste, la proteína es estable durante una semana en el suero almacenado a 4° C. Los problemas asociados con la medición de proteínas específicas y la degradación del antígeno no son tan agudos para la medición de moléculas pequeñas, pero siempre es buena práctica de laboratorio almacenar los fluidos biológicos a 4° C si el análisis se va a realizar en el mismo día y en estado congelado si el análisis se va a realizar en un tiempo mayor.

Debe recalarse que la reactividad inmunológica de una molécula puede no estar relacionada con su actividad biológica. La importancia de esta distinción se ilustra mediante la medición inmunológica de alfa₁-antitripsina y C3, el tercer componente de complemento. Alfa₁-antitripsina es un potente inhibidor de la enzima proteolítica tripsina y su producción está bajo control genético. En ciertos individuos ocurren variaciones genéticas en las que se estima que la molécula está presente a niveles normales cuando es medida por técnicas inmunoquímicas, pero la capacidad de inhibición enzimática de la molécula está enormemente deteriorada. Las variantes genéticas reaccionan inmunoquímicamente tan eficazmente como las moléculas que funcionan normalmente; sin embargo, hay una gran diferencia biológica. Otro ejemplo, C3, es una molécula razonablemente estable en el suero, pero en otros fluidos biológicos, como el líquido sinovial y el líquido cefalorraquídeo, C3 no puede estar presente como una molécula intacta. Los niveles de C3 pueden parecer normales o elevados cuando son obtenidos por métodos inmunológicos, aunque en realidad hay un nivel bajo de la molécula completa. Esta discrepancia es atribuible a la reacción del anticuerpo con los productos de degradación de C3, los cuales retienen los determinantes antigénicos apropiados. Ejemplos de la reactividad inmunológica sin actividad biológica ocurren con frecuencia y demuestran que los niveles normales de las moléculas analizadas por los métodos



inmunológicos no predicen necesariamente la actividad funcional normal.

Las mediciones cualitativas y cuantitativas del antígeno en los líquidos biológicos requieren el uso de un reactivo anticuerpo sumamente específico y un estándar de referencia conocido del antígeno. La reactividad del anticuerpo con el antígeno en el fluido biológico del paciente se compara con la reactividad del anticuerpo con el antígeno estándar. En general, los estándares se suministran en los estuches de prueba inmunológicos. Si estos estuches de prueba son aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos, el analista puede estar razonablemente seguro que el reactivo anticuerpo está detectando el antígeno, según declara el fabricante. Sin embargo, es buena práctica evaluar el sistema de prueba con antígenos de referencia obtenidos de otras fuentes cuando se usan métodos inmunológicos. La Organización Mundial de la Salud provee el antígeno de referencia para muchas de las proteínas séricas como estándares primarios. Los estándares secundarios han sido desarrolladas por el Colegio de Patólogos Estadounidenses en colaboración con los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) y están fácilmente disponibles. Estos materiales de referencia proporcionan al analista un nivel de confianza de que el laboratorio está proporcionando mediciones válidas de los antígenos en los líquidos biológicos (Tabla 12-1). Los reglamentos federales establecidos en la Ley de Mejoramiento de Laboratorios Clínicos de 1988 (CLIA '88) definen los requisitos de laboratorio para validar la exactitud y la precisión de los ensayos clínicos. Los datos de los fabricantes pueden usarse para los estuches empleados sin modificación. De otra manera, debe mantenerse una documentación minuciosa de la exactitud, la precisión, la linealidad, la sensibilidad, y los rangos normales. La verificación de calibraciones periódicas y los programas de control de calidad también son requeridas por la CLIA.

Ejemplos de Moléculas en Fluidos Biológicos que se Miden Frecuentemente por Técnicas Inmunológicas

Moléculas grandes	Moléculas pequeñas
Inmunoglobulinas (IgG, IgA, IgD, IgE)	Digoxina y digitonina
Componentes del complemento C3, C4, factor B	Antibióticos
Factores de coagulación (factor VIII, fibrinógeno)	Medicamentos citotóxicos
Lipoproteínas	Prostaglandina
Hormonas proteicas	Hormonas (esteroides, hormonas tiroideas)
Proteínas de fase aguda ("1-antitripsina, proteína reactiva C)	Teofilina
Albumina	Medicamentos anticonvulsivos
Proteínas seleccionadas de orina de Líquido cefalorraquídeo	Medicamentos antiarrítmicos
Antígenos virales	Fármacos de abuso

Imunodifusión (Ouchterlony)

La inmunodifusión se usa comúnmente para determinar si el anticuerpo o el antígeno están presentes en una solución de prueba. También puede usarse para establecer si hay cambios en la estructura antigénica o para estimar la pureza del antígeno o del anticuerpo.

Principios

Los principios de esta técnica se tratan en el Capítulo 11.



Requisitos y preparación de la muestra

Las muestras deben tener una concentración apropiada del antígeno o anticuerpo de prueba a fin de que se lleve a cabo una reacción detectable. Generalmente deben probarse varias diluciones del anticuerpo y el antígeno antes de observar el resultado deseado. El suero o el plasma es a menudo apropiado con la dilución apropiada. A menudo la orina y el líquido cefalorraquídeo deben ser concentradas. Después que las muestras estén concentradas, no deben contener una concentración de sal muy alta o un pH, ya que puede impedir la realización de la reacción.

Reactivos

Si se va a probar la pureza de un anticuerpo, es aconsejable tener el antígeno puro y una serie de soluciones que contengan posibles antígenos de reacción cruzada. Por contraste, si se va a probar la pureza de un antígeno, uno debe usar los anticuerpos que pueden reaccionar con posibles contaminantes del antígeno.

Problema común

Puede haber una dilución inadecuada del antígeno o el anticuerpo.

Interpretación de los resultados

La interpretación de los resultados se trata en el Capítulo 11.

Limitaciones

La técnica de Ouchterlony requiere una concentración del antígeno mayor que 45 $\mu\text{g/mL}$ y por lo tanto no es tan sensible como otras técnicas. Tampoco es tan discriminatoria como la inmunoelectroforesis y resuelve solo unos cuantos antígenos comparados con otras técnicas. Las moléculas grandes no difunden fácilmente en el gel y la técnica tiene una baja resolución para éstas.

Inmunoelectroforesis

La técnica inmunológica de la inmunoelectroforesis (IEF) se usa principalmente como un procedimiento cualitativo para evaluar las características electroforéticas e inmunológicas de proteínas y glicoproteínas en el suero, la orina, o el líquido cefalorraquídeo. La IEF es una técnica más sofisticada que la electroforesis de proteínas séricas y se usa habitualmente para caracterizar cualitativamente las anormalidades de proteínas específicas o para analizar la composición de una mezcla compleja de las proteínas en fluidos biológicos. La inmunoelectroforesis no se considera un método de tamizaje.

Principios

La inmunoelectroforesis es un procedimiento en dos etapas. El primer estadio incluye la

separación de los componentes del material antigénico en los fluidos biológicos mediante su migración diferencial en un campo eléctrico. En general, las proteínas séricas pueden separarse en cinco regiones discretas (albúmina, α_1 , α_2 , β y γ); esta etapa del procedimiento se denomina *electroforesis de zona*. La segunda etapa de esta técnica es la caracterización inmunológica de cada una de las proteínas separadas por los procedimientos de inmunodifusión. En este proceso, el anticuerpo difunde en el gel y la reacción antígeno-anticuerpo es visualizada por precipitación. La Fig. 12-2 ilustra la técnica de inmunoelectroforesis. El líquido biológico por analizar se coloca en el punto de aplicación (pozo de antígeno). Debido al pH alcalino de la solución amortiguadora de la agarosa, la mayoría de las moléculas biológicas adquieren una carga negativa neta y en un campo eléctrico migrarán hacia el ánodo. Si se usan muestras séricas, las proteínas se separan en cinco regiones distintas cuando se establece una diferencia potencial de 3.3 V/cm a través de la placa de agarosa por 30 a 60 minutos. La albúmina recorre la mayor distancia hacia el ánodo. Después de la albúmina están las regiones α_1 , α_2 , β y γ respectivamente. Luego que termina la electroforesis, los antiseros se colocan en la batea paralela del anticuerpo y se permiten difundir hacia las proteínas electroforéticamente separadas. Después, se registran la densidad, la posición y la forma de las bandas de inmunoprecipitinas resultantes como un medio de describir cada una de las proteínas precipitadas.

Los registros permanentes de los patrones inmunoelectroforéticos pueden obtenerse cuando las bandas de precipitina se pigmentan con tinciones proteicas, como el negro de amido o el azul de Coomassie. Algunos laboratorios obtienen los registros permanentes al fotografiar las bandas de inmunoprecipitina usando una iluminación indirecta sobre el gel teñido.

Requisitos y preparación de la muestra

Suero.

La mayoría de los procedimientos inmunoelectroforéticos se establecen para caracterizar las proteínas séricas que están presentes en concentraciones mayores de 500 $\mu\text{g/mL}$. El sistema puede usarse para detectar albúmina, las inmunoglobulinas y alrededor de otras 30 proteínas séricas presentes al menos en estas concentraciones. No se requiere preparación adicional del espécimen sérico. La muestra debe almacenarse congelada para preservar los antígenos si el procedimiento se va a retrasar más de un día después de recibir del espécimen. El plasma se considera una muestra inapropiada para la inmunoelectroforesis debido a las altas concentraciones del fibrinógeno en una muestra no coagulada.

Orina.

Según se mencionó antes, las técnicas inmunoelectroforéticas se usan para caracterizar proteínas que están presentes en concentraciones mayores de 500 $\mu\text{g/mL}$. La orina contiene generalmente concentraciones diluidas de la proteína y por consiguiente debe ser concentrada para traer las concentraciones de proteína hasta un rango cuantificable por el procedimiento inmunoelectroforético. Los procedimientos de concentración incluyen generalmente el uso de las membranas semipermeables que permiten el paso del agua y las sales a través de ellas pero no de las proteínas. Los métodos que concentran las sales urinarias, como la liofilización, no son aceptables. Muchas de las proteínas de orina pueden ser detectadas por los



procedimientos inmunolectroforéticos si la orina está concentrada de 50 a 100 veces. Los especímenes de orina deben almacenarse congelados si se presupone cualquier retraso en el análisis inmunolectroforético.

Líquido cefalorraquídeo.

El líquido cefalorraquídeo es también una solución proteica diluida que requiere concentrarse antes de que pueda realizarse la inmunolectroforesis. El volumen original debe reducirse 50 a 100 veces para que la albúmina, transferrina, e inmunoglobulinas, las proteínas principales de importancia clínica, puedan detectarse. De nuevo, el almacenamiento de la muestra en un estado congelado es importante si el análisis se va a retrasar más de 1 día.

Reactivos

En la inmunolectroforesis, se necesitan tres reactivos de alta calidad: agarosa, la solución amortiguadora, y el reactivo anticuerpo específico. La Agarosa, a diferencia del agar, no desarrolla cambios superficiales que puedan dificultar la migración de las proteínas durante la electroforesis. La electroendosmosis es menos notoria cuando se usa agarosa.

La inmunolectroforesis se lleva a cabo generalmente en un medio conteniendo un amortiguador (pH 8.6). El barbitol, o el ácido barbitúrico se agregan con frecuencia a la solución amortiguadora, no solo porque tiene buenas propiedades amortiguadoras, sino también porque es un excelente agente bacteriostático. Es necesario utilizar la solución amortiguadora recién preparada cada vez que se lleva a cabo la inmunolectroforesis.

Deben elegirse cuidadosamente las propiedades del reactivo anticuerpo usado para detectar las diversas proteínas que han migrado. Este reactivo anticuerpo debe tener un buen desempeño en la reacción de inmunoprecipitación y debe ser titulado a la dilución que dará la máxima precipitación de banda para aquellas proteínas cuantificables que están presentes en la concentración más baja.

Instrumentación

Se requieren cuatro piezas específicas de equipo para llevar a cabo la inmunolectroforesis: la fuente de energía, los tanques del amortiguador, el material absorbente adecuado, y la plantilla para cortar agar. La fuente de energía usada en el paso electroforético del procedimiento debe ser capaz de suministrar un voltaje constante durante varias horas en una velocidad de 3 a 5 V/cm. Los tanques de la solución amortiguadora deben contener suficiente amortiguador para prevenir los cambios en el pH durante el paso de electroforesis de la técnica. Los electrodos deben estar hechos del platino debido a su alta conductividad y alta resistencia al deterioro químico. El material absorbente debe ser poroso e inerte y debe permitir el libre paso del amortiguador del tanque a la placa que contiene la agarosa. El material absorbente debe tener baja resistencia eléctrica. El material que tiene una alta resistencia eléctrica puede causar que el sistema se sobrecaliente, produciendo resultados incorrectos.

Problemas comunes

La inmunolectroforesis es un sistema multicomponente que requiere una estrecha atención a cada uno de los componentes principales. A continuación hay una lista de los problemas



comunes.

- 1 La solución amortiguadora agotada, causa migración inadecuada de las proteínas durante la separación electroforética. Esto puede causar sobrecalentamiento de la agarosa, que puede ocasionar desnaturalización de la proteína y la destrucción de los determinantes antigénicos. Una solución amortiguadora se agota cuando se usa en demasiadas corridas electroforéticas.
- 2 La concentración inadecuada de los especímenes, resulta en la ausencia de precipitación, agregados proteicos insolubles, o una concentración demasiado alta para ser observada.
- 3 La colocación inapropiada del material absorbente en la placa de agarosa y los tanques del amortiguador, dan lugar a un flujo intermitente o no uniforme de electricidad a través de la placa de agarosa durante el procedimiento electroforético. La colocación inadecuada del material absorbente en la placa de agarosa es una fuente frecuente de errores en esta técnica.
- 4 Las navajas defectuosas de la plantilla, causan cortes deficientes en la placa de agarosa generando artefactos en las propiedades de difusión del reactivo anticuerpo.
- 5 La dilución inadecuada del antisuero, generalmente con pérdida de la reacción de precipitación.
- 6 Inapropiada fuerza iónica del amortiguador. La fuerza iónica de la solución amortiguadora usada debe ser suficientemente baja de manera que al inducir la migración del material antigénico, la carga eléctrica se confiera principalmente a los antígenos en vez de los iones del amortiguador.
- 7 Sobrecalentamiento, generalmente causado por material absorbente inadecuado, solución amortiguadora agotada, o por demasiado tiempo de migración electroforética, resultando en la desnaturalización de las proteínas.
- 8 Tiempo excesivo en el paso de inmunodifusión, dando lugar a las líneas de inmunoprecipitación en las posiciones inapropiadas, haciendo la interpretación dudosa. Las concentraciones de los antisueros y antígenos deben titularse hasta un punto en donde la máxima línea de precipitación pueda observarse entre 14 y 24 horas.
- 9 Tinción y procedimientos fotográficos inadecuados.

Interpretación de los resultados

El análisis inmunoelectroforético de los fluidos biológicos requiere un amplio entendimiento de los procesos de separación electroforética de las proteínas y el análisis de inmunodifusión. La Fig. 12-3 ilustra el uso de esta técnica en la interpretación del suero normal y anormal. El análisis de estas bandas de inmunoprecipitina puede proporcionar mucha información clínica útil. La presencia de las inmunoglobulinas monoclonales u oligoclonales, la presencia o ausencia de proteínas específicas, la alfa₁-antitripsina, y así sucesivamente pueden usarse para el diagnóstico de los procesos de enfermedad.

Contrainmunolectroforesis

La contrainmunolectroforesis también se denomina *doble electroinmunodifusión*. Esta



técnica se usó para la detección de antígenos únicos presentes en la muestra del paciente. En gran parte se ha reemplazado por la inmunofijación. Por favor refiérase a la segunda edición para los detalles.

Inmunofijación (Transferencia Western)

La técnica de inmunofijación, conocida como el método de transferencia Western, a menudo se usa en las aplicaciones clínicas para confirmar la presencia de un anticuerpo (como el anticuerpo del virus de la inmunodeficiencia humana, VIH) contra antígenos específicos. La técnica también se usa para la detección de proteínas específicas, como las isoformas apo E.

Principios

El método de inmunofijación es un procedimiento de tres etapas que usa la electroforesis en los dos primeros estadios. Primero, se somete una mezcla de antígenos a electroforesis en un medio de soporte apropiado, como poliacrilamida, agarosa neutral o papel para separar los componentes mediante las diferencias de carga y tamaño. Después de la primera etapa, la película de agarosa se cubre con una hoja del papel filtro constituido principalmente de nitrocelulosa. En un segundo paso electroforético, la proteína es transferida del soporte a la nitrocelulosa. La nitrocelulosa tiene la propiedad de unirse eficaz e irreversiblemente la proteína transferida. La hoja de nitrocelulosa es luego tratada con una solución de proteína, que reacciona con todos los sitios restantes, reduciendo al mínimo la unión inespecífica en el próximo paso. A continuación, se permite reaccionar una solución del anticuerpo, generalmente el suero de un paciente, con la hoja de nitrocelulosa. Entonces, el exceso de anticuerpo se extrae mediante un lavado. La hoja de nitrocelulosa se incuba con un segundo anticuerpo marcado que tiene especificidad para el primer anticuerpo. La marca permite la detección de la reacción original antígeno-anticuerpo. Si la marca es una enzima, como la peroxidasa, la reacción es detectada, por ejemplo, por precipitación del sustrato de un colorante de bencidina. Se presenta un diagrama en la Fig. 12-4.

Reactivos

La película de agarosa debe contener una solución amortiguadora apropiada para que se lleve a cabo una separación adecuada de la mezcla de antígenos. La hoja de nitrocelulosa debe poder absorber las proteínas.

Reactivo anticuerpo.

El reactivo anticuerpo marcado debe tener una alta especificidad y alta actividad específica para que pueda detectar solo el anticuerpo o la proteína de prueba deseados y que la sensibilidad del ensayo sea lo suficientemente alta para determinar la presencia de la reacción.

Problemas comunes

Los ensayos usan comúnmente las reacciones coloridas de peroxidasa para detectar la presencia del anticuerpo o el antígeno. Los ensayos requieren a menudo que individuos

capacitados interpreten los patrones resultantes.

Sensibilidad a la prueba e interpretación de resultados

Esta técnica es casi tan sensible como la técnica de inmunoensayo enzimático. Sin embargo, mientras que los inmunoensayos enzimáticos se usan como ensayos cuantitativos, las transferencias Western y otros métodos de inmunofijación se usan principalmente como técnicas cualitativas; o sea, se usan para determinar la presencia o la ausencia de una proteína o anticuerpo particular. Uno de los propósitos para los que se usa ampliamente la técnica, es la confirmación de los resultados del tamizaje del VIH. La sensibilidad de la técnica puede ser la detección de menos de 1 ng/mL de proteína de prueba.

Inmunoelectroforesis Bidimensional

La inmunoelectroforesis bidimensional se usa como una técnica de investigación para la separación analítica de antígenos estrechamente relacionados, con propiedades electroforéticas similares. Se usa en situaciones especiales para identificar la heterogeneidad de ciertas proteínas como el factor VIII (factor antihemofílico) o para distinguir variantes genéticas de algunas proteínas, como las alfa₁-antitripsinas. Es un procedimiento difícil y lento que es poco probable de usarse en la mayoría de los laboratorios.

Principios

Este procedimiento es una técnica de dos etapas que usa la electroforesis en ambas. La mezcla de antígenos es corrida electroforéticamente por primera vez en agarosa neutral para separar los componentes de acuerdo a su carga. Después de esta primera etapa, la tira de agarosa que contiene la proteína separada se transfiere a una placa más grande y se coloca en estrecho contacto con un gel que contiene el anticuerpo. Se aplica una corriente eléctrica en una dirección perpendicular a la primera separación electroforética para que migren los antígenos en la agarosa que contiene el anticuerpo, formando arcos de inmunoprecipitación. Esta segunda etapa de electroforesis puede durar hasta 20 horas. Después de la reacción, la placa se lava en la solución salina para remover el exceso de proteína, el exceso de líquido se presiona con papel filtro, y la placa se fija y se tiñe.

Inmunodifusión Radial

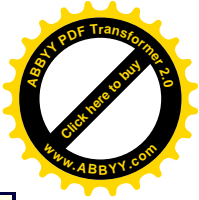
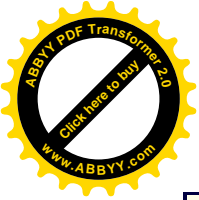
Debido a su sencillez y exactitud, la inmunodifusión radial es una de las técnicas más comúnmente usadas para la cuantificación de antígenos.

Principios

Los principios de la inmunodifusión radial se tratan en el Capítulo 11.

Requisitos y preparación de la muestra

El ensayo es válido solamente sobre un estrecho rango de concentraciones de antígenos. Esto es determinado en parte por la concentración de anticuerpo en el gel y por la facilidad de difusión del antígeno en el gel. Para algunos antígenos, son necesarias varias diluciones para lograr el rango óptimo de concentración. La orina y el líquido cefalorraquídeo en general, deben ser concentrados antes de que puedan ser cuantificados por esta técnica. El exceso de



sales debe eliminarse de estos especímenes si han sido concentrados por liofilización.

Reactivos

El anticuerpo monoespecífico contra el antígeno deseado es el único reactivo crucial.

Problemas comunes

Si el antisuero se une a más de un antígeno, puede verse un anillo doble. La temperatura debe mantenerse constante. Si el antígeno es demasiado grande o está agregado, el patrón de difusión resultante no será cuantitativo.

Sensibilidad a la prueba

La sensibilidad a la prueba depende del tamaño de antígeno; a mayor tamaño, la difusión será más baja. Para la mayoría de las proteínas séricas, el ensayo es sensible hasta 50 µg/mL.

Immunolectroforesis Laurell ("Cohete")

La inmunolectroforesis de Laurell es un método cuantitativo que se usa para medir los antígenos en los fluidos biológicos. Proporciona datos para los antígenos individuales similares a aquellos obtenidos por inmunodifusión radial. La ventaja de esta técnica sobre la inmunodifusión radial es que el tiempo requerido para producir resultados es de 4 a 6 horas en lugar de 18 a 72 horas. Este ahorro en tiempo es atribuible al uso de la electroforesis en vez de la difusión pasiva. La técnica del "cohete" es generalmente más costosa de realizar que la inmunodifusión radial debido a la necesidad de equipo electroforético y la mayor cantidad del reactivo anticuerpo y agarosa usados. Se prefiere usar esta técnica para medir los antígenos presentes en concentraciones de 50 a 20,000 µg/mL. Los antígenos que se miden con mayor frecuencia son las proteínas séricas.

Principios

En esta técnica el antígeno se combina con el anticuerpo durante la electroforesis del antígeno en un medio que contiene el anticuerpo como la agarosa. El pH del medio anticuerpo-agarosa es generalmente de 8.6, para que el anticuerpo tenga poca o ninguna carga negativa neta y no se desplace cuando se aplique la corriente al gel. El antígeno que va a medirse debe tener una carga negativa neta para que migre en el gel hacia el ánodo al aplicarse la corriente eléctrica. Cada muestra se aplica en un pozo circular bien recortado situado en un extremo del gel. La corriente eléctrica aplicada a la placa de gel causa la migración del antígeno hacia el centro de la placa. A medida que migra el antígeno y se combina con el anticuerpo en el gel, se forman bandas de precipitado cónicas en forma de cohete. A medida que el antígeno libre que se encuentra en la banda de precipitado, en forma de cohete, migra en el precipitado bajo la influencia del campo eléctrico, el precipitado se disuelve en el exceso de antígeno. El extremo frontal del cohete se reconfigura adelante del antígeno en la dirección de la migración del antígeno. La cantidad de antígeno dentro del extremo frontal disminuye gradualmente hasta alcanzar la equivalencia del antígeno-anticuerpo. En este punto, se forma un precipitado estable, y el antígeno ya no migrará. La longitud del cohete en la muestra de prueba es proporcional al logaritmo de la concentración del antígeno en el estándar de referencia corrido



en el mismo gel (Fig. 12-5).

Requisitos y preparación de la muestra

Al igual que en las otras técnicas inmunológicas, debe ponerse atención para asegurarse que el antígeno que va a medirse no se degrade o desnaturalice. Estas precauciones son especialmente importantes para los componentes del complemento, como C3 y C4 y la inmunoglobulina IgM. La degradación de la molécula de proteína puede causar que se formen varios picos dentro del mismo cohete. En algunas enfermedades, la degradación de las proteínas C3 y C4 ocurre in vivo y la formación de varios picos tiene importancia clínica, pero si la muestra de prueba no se ha manejado y almacenado adecuadamente antes del ensayo, la importancia de la observación de varios picos será difícil de interpretar.

Problemas comunes

1. Migración inapropiada de antígenos. Para una medición exacta de la concentración de antígenos con esta técnica, el antígeno debe ser capaz de adoptar una carga negativa neta a un pH de 8.6. Si el punto isoeléctrico del antígeno es mayor a 7.5, el antígeno no migrará adecuadamente en el medio de agarosa con el anticuerpo para obtener picos de alta resolución.
2. Cama absorbente inadecuada. Como en todos los procedimientos electroforéticos, es necesaria la colocación adecuada de las camas absorbentes en el borde de la placa del gel de tal manera que todo el gel tenga una corriente eléctrica constante. Si el punto de contacto de la cama absorbente con el gel es indebido, el antígeno no migrará uniformemente a lo largo de toda la placa, dando como resultado picos falsos.
3. Sobrecalentamiento durante la electroforesis. Ya que el tiempo de electroforesis en esta técnica es prolongado, es esencial prestar mucha atención al enfriamiento de la placa del gel durante la electroforesis. El sobrecalentamiento puede causar el gel se seque, que el antígeno se desnaturalice, y que el antígeno migre indebidamente.
4. La medición inadecuada de la altura del pico.

Sensibilidad a la prueba y coeficiente de variación

La técnica de la inmunolectroforesis de Laurell (cohete) tiene una sensibilidad de aproximadamente 50 $\mu\text{g/mL}$ para proteínas séricas encontradas en los líquidos biológicos. Los límites superiores de detección son generalmente alrededor de 20,000 $\mu\text{g/mL}$ para estos antígenos. Las variaciones dentro de la corrida oscilan entre 5% y 10%, mientras que las variaciones entre las corridas, cuando se mide el mismo antígeno, varían de 10% a 15%.

Inmunomefelometría (ver Capítulo 4, págs. 101-103)

Nefelometría

Principios.

Cuando un anticuerpo y un antígeno se combinan en solución, se forman rápidamente pequeños agregados que pueden dispersar la luz, dando una apariencia turbia a la solución. Estos agregados luego se asocian lentamente para formar una matriz más grande, que finalmente da origen al precipitado que se observa en los ensayos de inmunoprecipitación como la difusión doble (Ouchterlony) o la inmunodifusión radial (Mancini).

El desarrollo de un ensayo clínicamente útil fue posible mediante la observación que para

algunas proteínas de plasma la intensidad de luz dispersada era una medida de la cantidad de precipitado formado, siempre y cuando la reacción se llevase a cabo con exceso de anticuerpo.

Un nefelómetro eficaz utiliza un rayo láser como su fuente de luz y un protocolo de dos mediciones de tiempo fijo. Un segundo instrumento usa una fuente de luz de tungsteno y mide la velocidad de formación del complejo.

Actualmente están disponibles métodos rápidos (segundos a minutos) y precisos para la medición específica de las proteínas de plasma, como la albúmina, las inmunoglobulinas, los componentes del complemento, y los reactivos de fase aguda así como las hormonas y los medicamentos terapéuticos.

En el Capítulo 11, se muestra la estructura de los agregados creados mediante la formación temprana de redes de complejos inmunes. Estos agregados de las reacciones primarias ocurren en cuestión de segundos a minutos, mientras que las interacciones secundarias que conducen a la precipitación ocurren en un período de horas.

Los ensayos de dispersión de luz miden esta temprana reacción de segundo orden, presumiblemente entre el antígeno y el anticuerpo de alta afinidad, en qué se forma una micela proteica suficientemente grande para dispersar la luz pero no lo suficientemente grande para precipitar.

Aunque la reacción inicial del antígeno con el anticuerpo es rápida, la acumulación de los complejos pequeños que dispersan la luz toma tiempo. Esta reacción, la formación de agregados, puede incrementarse enormemente con la adición del polímero soluble en agua polietilén glicol (6000 daltones) a concentraciones de 2% a 4%. El polímero causa un aumento en la dispersión de luz varias veces mayor que el valor obtenido en su ausencia mientras que reduce el tiempo de reacción alrededor de diez veces

Requisitos y preparación de la muestra.

Los líquidos biológicos que se determinan con mayor frecuencia son suero y líquido cefalorraquídeo, aunque la orina también puede medirse.

Reactivos.

El reactivo anticuerpo debe ser de muy alta afinidad y tener un título alto, y debe ser especialmente aclarado mediante microfiltración para minimizar la dispersión de luz de fondo.

Problemas comunes

1. El anticuerpo no está en exceso. En estas circunstancias la cantidad de formación de precipitado se registrará como un valor bajo falso.
2. El valor del ruido de fondo de dispersión de luz es demasiado alto. Las determinaciones nefelométricas de velocidad se prefieren a las determinaciones de punto final porque reducen al mínimo la contribución del ruido de fondo. Por ejemplo, es posible detectar un aumento de 5% de dispersión sobre el ruido de fondo usando una medición de velocidad. Por contraste, tal diferencia puede no ser cuantificable como un cambio de punto final. La lipidemia causará un alto ruido de fondo de la dispersión.
3. La interferencia es causada por una solución colorida. Los métodos de punto final son los más afectados por las soluciones de color. Estos absorben la luz dispersada, tendiendo a producir valores más bajos. Sin embargo, aun las mediciones cinéticas dan valores bajos en soluciones altamente coloridas.
4. El mezclado es insuficiente. Dado que el método de velocidad requiere agitación constante para hacer las partículas uniformes, la eficacia del mezclado debe vigilarse constantemente.



5. Los complejos inmunes preformados en el suero del paciente pueden causar valores falsos altos o valores falsos bajos, dependiendo de la manera en que se mide la velocidad de reacción y cómo se hace la corrección del ruido de fondo.

Limitaciones.

Para la mayoría de los ensayos, la cuantificación es válida solo cuando el reactivo anticuerpo está en exceso. Aunque cada fabricante de instrumentos ha desarrollado formas evaluar el exceso de antígeno, el método infalible requiere que el laboratorista lleve a cabo las mediciones a dos diferentes diluciones, o tener disponible una electroforesis de proteínas séricas de la muestra para comparación. El método está limitado a las mediciones de los antígenos que forman suficientes redes para dispersar la luz, como las proteínas. Se requieren pasos especiales para las moléculas pequeñas (ver el siguiente texto).

Inmunoensayo de inhibición nefelométrica (IEIN)

Principios.

Si una molécula pequeña, como la digoxina o un medicamento, está covalentemente unida a una proteína acarreadora grande como la albúmina sérica bovina, el conjugado resultante actúa como un antígeno grande que dispersa la luz cuando reacciona con el anticuerpo dirigido contra la molécula pequeña. En este caso la formación del complejo puede ser inhibida por la adición del hapteno específico. La inhibición es dependiente de la dosis, resultando en un ensayo cuantitativo para la molécula pequeña. Con una manipulación apropiada de los parámetros, uno puede ajustar el número de grupos hapténicos para una precipitación adecuada permitiendo al mismo tiempo una máxima sensibilidad para la inhibición por el hapteno libre.

La adición de la muestra conteniendo el hapteno libre a la mezcla de reacción, disminuye la disponibilidad del anticuerpo y causa una disminución en la señal generada por una preparación de un estándar del conjugado con el hapteno (Fig. 12-6).

Se han desarrollado métodos para el análisis rápido de fármacos que ocurren en cantidades de miligramos por litro, como la fenitoína, el fenobarbital y la teofilina.

Requisitos y preparación de la muestra.

El suero es el fluido biológico que se determina con mayor frecuencia. Los compuestos más medidos son los fármacos como la teofilina y la fenitoína.

Reactivos.

Los requisitos para el reactivo anticuerpo son similares a los de cualquier técnica nefelométrica. El reactivo antígeno está compuesto del medicamento que se va a monitorear unido covalentemente a varios sitios de una proteína, generalmente albúmina.

Instrumentación.

La instrumentación es la misma que se usa en la nefelometría.

Problemas comunes.

Los problemas son similares a aquellos descritos para la nefelometría, excepto que la determina el título de la reacción para tener siempre un exceso de antígeno.

Modificaciones adicionales de los ensayos

Dispersión de luz amplificada por partículas.

Debido a que la cantidad de dispersión de luz depende del tamaño, la cantidad, y el índice de refracción del agente dispersante, un aumento de cualquiera de estos parámetros debe producir una mayor sensibilidad. Este potencial se hace realidad cuando los antígenos o los anticuerpos se acoplan a diversas partículas acarreadoras inertes, pero las cuentas de látex de poliestireno se han convertido en las partículas de elección debido a la disponibilidad y a un mejor control de las condiciones del acoplamiento. Este tipo de ensayo es esencialmente un procedimiento de aglutinación (ver discusión de ensayos de aglutinación adelante). El método también ofrece una generación de señales más rápida y mayor economía en los reactivos. La prueba de fijación en látex para la detección del factor reumatoide es el ejemplo clásico de este tipo de ensayo, aunque depende de la observación visual de la aglutinación y es por lo tanto solamente semicuantitativo. Recientemente, se han desarrollado varios métodos de amplificación por partícula, tanto para ensayos directos como de inhibición, y se han empleado una amplia variedad de técnicas para la detección de dispersión de luz.

Anticuerpos monoclonales como reactivos.

El desempeño de los ensayos de dispersión de luz depende en gran medida de la calidad del antisuero usado. Con reactivos policlonales convencionales hay una necesidad continua de monitorear y ajustar el título de antisuero, la especificidad, y la afinidad.

Tal variabilidad a menudo es superada con el uso de un anticuerpo monoclonal. Sin embargo, a menos que el antígeno tenga muchos sitios antígenicos idénticos, un anticuerpo monoclonal único no puede causar formación de matrices y generará poca o ninguna dispersión de luz. Si se puede hacer una mezcla apropiada de anticuerpos monoclonales, se formarán complejos causando dispersión de luz cuantificable. Este mezcla de anticuerpos monoclonales o el uso de monoclonales en los ensayos de dispersión de luz amplificada por partículas asegura la constancia de la producción del reactivo y confiere estabilidad adicional y especificidad a estos ensayos.

Ensayos de aglutinación

La aglutinación es el agrupamiento y la sedimentación del antígeno después de la reacción con el anticuerpo. Se observó por primera vez al examinar la reacción de bacterias incubadas con suero de un paciente infectado. La observación de la aglutinación de los eritrocitos después de la incubación con suero condujo al descubrimiento de los grupos sanguíneos ABO. La aglutinación se ha usado ampliamente como un sistema de detección debido a su facilidad y versatilidad. Sin embargo, solamente es semicuantitativo y tiene reproducibilidad únicamente dentro de un rango de dilución de hasta cuatro veces. Los anticuerpos aglutinantes (*aglutininas*) pueden dirigirse contra antígenos que ocurren en forma natural en la superficie de las células (*aglutinación activa o directa*) o contra las sustancias que se han aplicado a la superficie de las células o de partículas inertes (*aglutinación pasiva o indirecta*).

Principios

Las reacciones de aglutinación dependen de la formación de puentes del anticuerpo por anticuerpos bivalentes (IgG) o multivalentes (IgM) entre partículas de antígeno con múltiples determinantes antígenicos. Las partículas grandes, como los eritrocitos o las bacterias, contienen muchos antígenos diferentes así como antígenos que aparecen cientos de veces en la célula o en la superficie de la partícula. Por lo tanto es posible que las moléculas del

anticuerpo se unan a más de un sitio en una sola partícula o se unan a sitios equivalentes en diferentes partículas. Esta unión se denomina *entrecruzamiento*. Los antígenos con un solo determinante antigénico no permitirían el entrecruzamiento y por consiguiente no aglutinarían. El entrecruzamiento puede crear una red de alto peso molecular que se agrupa y finalmente precipita. Debido a su tamaño y multivalencia, se dice que la IgM es 750 veces más eficaz para la aglutinación que la IgG. Las reacciones de aglutinación son usadas en general para detectar un anticuerpo dirigido contra antígenos que se encuentran en forma particulada; la cuantificación se realiza mediante dilución seriada del suero. La *aglutinación inversa* puede usarse para detectar antígeno soluble al utilizar el anticuerpo adsorbido sobre la superficie de las células o partículas. Las reacciones de aglutinación son leídas a simple vista o con algún medio de amplificación. El grado de la aglutinación se clasifica 1+ a 4+ por estimación. El título del suero es el recíproco de la dilución más alta que produce aglutinación visible (1+).

Factores que afectan la reacción de aglutinación

Los factores que influyen la aglutinación incluyen; partículas con carga; tipo del anticuerpo; concentración de electrolitos; viscosidad del medio; concentración de los reactivos; concentración y ubicación de los determinantes antigénicos; y el tiempo y la temperatura de incubación.

Carga de la partícula.

Los eritrocitos, las bacterias, y las partículas inertes como el látex tienen una carga neta negativa en la superficie llamada el *potencial zeta*. Estas cargas deben suprimirse para permitir el entrecruzamiento que dará lugar a la aglutinación.

Tipo de anticuerpo.

Los anticuerpos de IgM son más eficientes para la aglutinación debido a su multivalencia y porque su tamaño permite una conexión más efectiva de los espacios entre las células causados por la repulsión de cargas.

Concentración de electrolitos y viscosidad.

La fuerza iónica del medio usado para la reacción de aglutinación puede ayudar a reducir la carga negativa superficial de las partículas. Esto puede realizarse mediante la adición de moléculas cargadas al medio, como la albúmina. El pH del medio debe ser cercano al que está presente en condiciones fisiológicas. A pH neutral, altas concentraciones de electrolitos actúan para neutralizar la carga negativa neta de las partículas. El aumento de la viscosidad del medio con moléculas polimerizadas, como el dextran, también ayuda a agrupar las partículas cargadas.

Determinantes antigénicos.

Como se indicó anteriormente, los antígenos con múltiples determinantes antigénicos son necesarios para la aglutinación. Un antígeno monovalente no permitiría el entrecruzamiento. La colocación de los determinantes antigénicos en la partícula también puede afectar la capacidad de aglutinación. Los determinantes antigénicos que se distribuyen de manera dispersa no serán tan fácilmente entrecruzados como los determinantes antigénicos que se distribuyen densamente. Los determinantes antigénicos también pueden ser inaccesibles para unirse al anticuerpo porque están ubicados dentro de las membranas de la célula.

Concentración, temperatura y tiempo de incubación.

A concentraciones altas de antígeno, la reacción con anticuerpo será más rápida. La

agitación de la suspensión de antígenos con la solución de anticuerpos aumentará la velocidad de reacción al incrementar el área superficial expuesta al anticuerpo. A concentraciones bajas de antígenos, el tiempo de reacción puede acortarse mediante centrifugación, que aumenta el contacto entre las partículas antigénicas y el anticuerpo. La concentración de las entidades reactivas por consiguiente puede influir en el tiempo de reacción. La temperatura de la incubación es también una variable importante. Algunos antígenos se unen más fácilmente al anticuerpo a 37° C. Estos antígenos incluyen microbios. Algunos antígenos reaccionan óptimamente con el anticuerpo a 4° C. Estas *aglutininas frías* incluyen el anticuerpo contra el antígeno *i* de los eritrocitos fetales e infantiles. La temperatura óptima para la reacción de aglutinación variará con diferentes sistemas antígeno-anticuerpo. La temperatura también afecta al comportamiento de los anticuerpos in vitro.

Aglutinación directa

Las pruebas de aglutinación directa se usan con frecuencia en el diagnóstico inmunológico de las infecciones microbianas. El título del suero refleja la concentración del anticuerpo predominante en el suero. La detección temprana de un título alto y la documentación de una elevación significativa en el título, son herramientas importantes en el diagnóstico. Los anticuerpos contra los organismos *Brucella* (brucelosis), *Salmonella* (fiebre tifoidea), y *Proteus* (fiebre de las Montañas Rocallosas) se detectan de esta manera. Las reacciones de aglutinación directas también se usan en la tipificación de los eritrocitos humanos en los bancos de sangre.

Diferentes antígenos bacterianos pueden dar diferentes modelos de aglutinación. Los anticuerpos contra flagelos bacterianos causan entrecruzamiento entre ellos mismos. Estos anticuerpos causan la formación de un aglutinado poco compacto, que se forma rápidamente. Los anticuerpos contra los antígenos en el cuerpo de la bacteria causan entrecruzamiento entre estos organismos. Esto da lugar a un precipitado granular, compacto, que se forma más lentamente.

Aglutinación indirecta

La aglutinación indirecta incluye la reacción del anticuerpo con antígenos que han sido transferidos pasivamente a la superficie de las partículas (Fig. 12-7). Se emplean eritrocitos, generalmente de humanos, ovinos, o de pavo. También se usan partículas inertes como el látex (0.81 μm de diámetro) y la bentonita (arcilla). Los polisacáridos y algunos antígenos proteicos, como la albúmina y derivados de proteína purificados son fácilmente adsorbidos sobre la superficie de la partícula. Otros antígenos requieren pretratamiento de las partículas con ácido tánico o cloruro de cromo, que modifican la superficie celular. El antígeno puede estar unido covalentemente a la superficie celular por moléculas bifuncionales, como la bisdiazobencidina o el glutaraldehído. La aglutinación indirecta se usa en el diagnóstico de sífilis. La prueba del Laboratorio de Investigación en Enfermedades Venéreas emplea cristales de colesterol recubiertos con el antígeno cardiolipina. La detección del factor reumatoide, útil para el diagnóstico de artritis reumatoide, usa la aglutinación de las partículas de látex recubiertas con IgG humana.

Inhibición de la aglutinación

La inhibición de aglutinación es una adaptación de la reacción de aglutinación que permite la detección y cuantificación del antígeno soluble. Las concentraciones del anticuerpo y las partículas son controladas cuidadosamente para prevenir el exceso de anticuerpo. El anticuerpo se incuba con la solución de antígenos de prueba y el antígeno se une a los sitios disponibles para combinación del anticuerpo. El anticuerpo luego se agrega a las suspensiones de antígenos particulados. La falla para aglutinar indica que se han saturado suficientes sitios que combinan anticuerpos con una forma soluble del mismo antígeno, por lo que son insuficientes los sitios de unión al anticuerpo disponible para la unión y entrecruzamiento del antígeno particulado. La cuantificación del antígeno soluble puede realizarse mediante la evaluación del grado de inhibición en diluciones seriadas de la solución del antígeno (Fig. 12-8).

Prueba de antiglobulina

La prueba de antiglobulina es una modificación de la reacción de aglutinación para permitir la detección de un anticuerpo incompleto (IgG), que puede no producir aglutinación incluso después de la unión a la superficie de la partícula. La capacidad para aglutinar de la IgG es menor que la de IgM porque su tamaño más pequeño es menos eficaz para conectar las partículas del antígeno. Si se agrega una antiinmunoglobulina o *reactivo de coombs* a las partículas no aglutinadas recubiertas por IgG, el reactivo de Coombs cerrará la brecha entre las partículas por medio de una unión bivalente. (Fig. 12-9). Esto permite el entrecruzamiento para lograr la aglutinación. La prueba de Coombs directa se usa en los bancos de sangre para determinar la presencia de anticuerpos de IgG contra los eritrocitos.

La prueba de Coombs indirecta es una variación de la prueba de antiglobulina y se usa para detectar anticuerpo libre contra los eritrocitos en el suero del paciente (Fig. 12-10). El suero se somete a tamizaje contra una batería de eritrocitos de antigenicidad conocida y variada. La aglutinación de las células a las cuales se ha agregado el suero de pacientes y el reactivo de antiglobulina, indica la presencia del anticuerpo en el suero del paciente contra un antígeno presente en las células aglutinadas.

Requisitos de la muestra

Las reacciones de aglutinación pueden usarse para medir los componentes del plasma, el suero o líquido cefalorraquídeo. La orina debe amortiguarse debido a su acidez usual. Ya que el complemento sérico puede afectar la aglutinación, puede ser necesaria la inactivación o la dilución para reducir al mínimo la acción del complemento.

Reactivos

Como en las técnicas de aglutinación de eritrocitos, los factores que determinan las reacciones son la carga de la partícula, el tipo de anticuerpo, la concentración de electrolitos, y la viscosidad. Cuando los eritrocitos se usan frescos, tienen un período máximo de almacenamiento de cerca de 2 semanas. Por consiguiente muchos fabricantes han desarrollado eritrocitos fijados (generalmente estabilizados con ácido tánico o glutaraldeído) o cuentas de látex para superar la necesidad de preparar los reactivos cada pocas semanas.



Instrumental

La gran ventaja de esta técnica es la sencillez de la instrumentación. Los resultados pueden ser detectados a simple vista o con la ayuda de un espejo o la lupa.

Problemas comunes

El exceso de antígeno a menudo da lugar a un fenómeno de prozona generando como resultados falsos negativos. El uso de los eritrocitos u otros reactivos caducados puede dar lugar a la falta de aglutinación.

Limitaciones

La técnica es solo semicuantitativa y por lo tanto solo permite estimados del valor real dentro de un factor de dilución de dos.

Ensayos de Fijación del Complemento

Las pruebas de fijación de complemento son probablemente las más sensibles de los procedimientos inmunológicos que se desarrollaron en los albores de la inmunología. Actualmente se han desarrollado pruebas más sensibles que la fijación de complemento, como el radioinmunoensayo y el inmunoensayo, pero las pruebas de fijación de complemento son todavía importantes, especialmente en el diagnóstico de las infecciones por hongos, virales, y parasitarias así como en la cuantificación de los niveles del complemento funcional (complemento hemolítico total) y componentes del complemento.

Proteínas del complemento

El término *complemento* se usa para denotar una serie de proteínas de plasma que se activan en forma secuencial después de las reacciones antígeno-anticuerpo. No todas las clases y subclases de inmunoglobulinas son capaces de activar el complemento o pueden activarlo en la misma medida (ver el cuadro 11-1). El complejo antígeno-anticuerpo usado en las pruebas de fijación de complemento por consiguiente debe incluir un anticuerpo que sea capaz de activar, o *fijar* el complemento. Del mismo modo que las reacciones de aglutinación, la IgM pentamérica es 1000 veces más efectiva para fijar el complemento que la IgG.

La primera proteína en la secuencia del complemento está ligada al segundo dominio constante de la cadena pesada (C_{H2}), el cual es inaccesible a un anticuerpo no unido o que no ha reaccionado. Después de la interacción y unión con el antígeno, los cambios conformacionales en la molécula de inmunoglobulina causan que la región de la bisagra se abra y el sitio de unión al complemento sea expuesto. Proteínas subsecuentes del complemento entonces se activan y pueden unirse a la membrana de la célula a la cual está unido el complejo antígeno-anticuerpo. La unión de la secuencia completa de las nueve proteínas complementarias produce pequeños defectos en las membranas de las células. Los contenidos citoplásmicos de las células se pierden mediante estos orificios, y se permite la entrada del líquido extracelular. Esto lleva a una expansión hipotónica que conduce a la lisis de la célula. Si las células usadas en la prueba son eritrocitos, la lisis celular da lugar a la liberación de la hemoglobina en el medio. La cantidad de hemoglobina es directamente proporcional a la cantidad de complemento fijado en la superficie de las células.



Pruebas de una etapa

Para evaluar los niveles del complemento totales (actividad del complemento que refleja las nueve proteínas principales del complemento) o para evaluar individualmente las nueve proteínas principales del complemento, se usa un sistema de prueba de una etapa. Se agrega un volumen constante de eritrocitos, generalmente de ovino, a una cantidad constante de anticuerpo anti-eritrocitos de ovino o *hemolisina*. Luego se agrega una fuente de complemento. Para las mediciones de complemento total, se utilizan diluciones del suero desconocido. Para la medición de los componentes del complemento, se usa suero adicionado con un exceso de cada uno de los componentes del complemento excepto el componente que se va medir. El grado de hemólisis se mide en un espectrofotómetro y es directamente proporcional a la cantidad de complemento disponible para la fijación en el suero de prueba (Fig. 12-11).

Algunas enfermedades inmunológicamente mediadas causan una disminución en los niveles del complemento sérico total o en los niveles de los componentes del complemento individuales. Además, se han descrito las deficiencias hereditarias de ciertos componentes del sistema del complemento.

Pruebas de dos etapas

La prueba de dos etapas de fijación de complemento se usa para medir el antígeno o el anticuerpo. En la primera reacción, el antígeno y el anticuerpo se incuban con una cantidad conocida del complemento. En la segunda etapa, se determina la actividad residual del complemento en la solución por un sistema indicador, como los eritrocitos de ovino que se recubren con hemolisina. El grado de hemólisis de las células indicadoras es inversamente proporcional a la cantidad de complemento fijado en la primera reacción (Fig. 12-12).

Para determinar los niveles de antígeno, se usa un volumen constante de anticuerpo. Para determinar los niveles del anticuerpo, se usa una cantidad constante de antígeno.

Requisitos y preparación de la muestra

Pueden analizarse el ácido etilendiaminotetracético en plasma (EDTA), suero y líquido cefalorraquídeo, pero son necesarias ciertas precauciones. Las muestras no pueden ser hemolisadas. El complemento endógeno de la muestra debe desactivarse, generalmente mediante el calentamiento del espécimen por 15 a 30 minutos a 56° C.

Reactivos

El complemento exógeno se debe preparar diariamente y no puede almacenarse. La actividad del complemento varía significativamente de lote a lote y debe estandarizarse diariamente.

Limitaciones

Las pruebas de fijación de complemento son sensibles a muchas variables. Dichas pruebas son inhibidas por la actividad anticomplementaria (factores que inactivan o interfieren con cualquiera de las proteínas del complemento) en el suero, incluidos los factores como los complejos inmunes circulantes (antígeno-anticuerpo), sueros lipémicos, inmunoglobulinas



agregadas, y la heparina.

Es crucial mantener constantes todos los componentes de la prueba excepto el que se va a medir. El número de eritrocitos, la concentración de complemento, y la concentración del antígeno deben definirse rigurosamente para las determinaciones de anticuerpos.

Las pruebas son influidas por la inestabilidad de algunas proteínas del complemento, la variabilidad en los eritrocitos, la variación entre lotes de hemolisina, y el estrecho rango de reactividad óptima para muchos reactivos. La necesidad de reactivos frescos y la gran variabilidad hacen que este ensayo sea uno de los más difíciles de realizar en un laboratorio.

El CDC (sistema de Centros para el Control de Enfermedades O “CDC”, en inglés) evalúa los reactivos de fijación de complemento y ha desarrollado procedimientos estandarizados para las pruebas de fijación de complemento.

Inmunoensayos de Indicador Marcado

Todos los inmunoensayos descritos anteriormente usaban mediciones directas de una propiedad física del complejo antígeno-anticuerpo o de los agregados formados secundariamente al paso inicial de unión (como precipitación o dispersión de luz). Al introducir un antígeno o un anticuerpo marcado con un indicador para detectar la reacción de unión inicial, uno puede lograr una mayor sensibilidad analítica. Estos inmunoensayos *de indicador marcado* usan como sistema de detección la medición más sensible de alguna propiedad de la molécula indicadora. Los indicadores, o etiquetas, comúnmente usados incluyen enzimas, moléculas fluorescentes o quimioluminiscentes, y compuestos radiactivos.

Los ensayos de indicador marcado son apropiados para las mediciones tanto cualitativas como cuantitativas. Su creciente popularidad es debida al hecho de que son sensibles, reproducibles, usan un mínimo de reactivos, y son apropiados para la automatización. Los inmunoensayos no isotópicos tienen la ventaja adicional sobre las técnicas radioinmunológicas en que no requieren de precauciones especiales y procedimientos de eliminación de desechos, necesarios para el manejo de radioisótopos.

Los inmunoensayos cuantitativos de este tipo usan generalmente IgG como el reactivo anticuerpo. Aunque son muy específicos en virtud de la especificidad del anticuerpo, las reacciones de unión son sensibles a las variaciones usuales en la temperatura, pH, fuerza iónica, y la matriz de la muestra o del estándar. El rango de sensibilidad analítica hasta de nanogramos por mililitro o incluso menor, permite que este tipo de ensayo se use para los compuestos que están presentes en concentraciones bajas, como las hormonas, las vitaminas, y los medicamentos.

Los inmunoensayos cualitativos de indicador marcado son con frecuencia menos sensibles pero son convenientes y muy populares en el laboratorio de serología para la detección de anticuerpos contra organismos infecciosos y para la caracterización de anticuerpos autoinmunes como los anticuerpos antinucleares del anticuerpo y antitiroideos.

Los inmunoensayos de indicador marcado pueden clasificarse en general como competitivos o no competitivos y como heterogéneos u homogéneos. Las reacciones competitivas usan generalmente el antígeno marcado y se llevan a cabo en presencia del exceso de antígeno. El compuesto analizado y el compuesto analizado marcado compiten para unirse a los sitios del anticuerpo. El ensayo de radioinmunoensayo (RIA) es el prototipo del

tipo heterogéneo de inmunoensayo competitivo y la técnica de inmunoensayo amplificado por enzima (“Enzyme-Multiplied Immunoassay Technique” o “EMIT”, en inglés. Ver el próximo capítulo) es un ejemplo del tipo homogéneo. Los ensayos no competitivos emplean generalmente un anticuerpo marcado y se llevan a cabo en presencia de exceso del anticuerpo. Con frecuencia estos ensayos son heterogéneos, usando un anticuerpo de captura unido a una fase sólida como una esfera plástica o a un tubo de ensayo, y una segunda fase que consiste del anticuerpo marcado en solución. Esto último tipo de ensayo es sinónimo de los términos; ensayo *inmunométrico* o de *sandwich*.

Marcas.

Para que una marca sea apropiada para usarse como un reactivo inmunoquímico debe tener ciertas cualidades. La marca debe tener alta reactividad específica, o sea, muchos eventos detectables por molécula del indicador por unidad de tiempo. La actividad específica no debe reducirse, o enmascararse, mediante la conjugación del indicador al antígeno o al anticuerpo. Las marcas de la enzima no deben estar presentes normalmente en la muestra en concentraciones suficientemente altas para interferir con la medición. Esto es crucial para los ensayos homogéneos, en los cuales la matriz de la muestra que contiene sustancias interferentes permanece en la mezcla de reacción durante el paso de medición. Varias enzimas, quelantes de metales, radioisótopos, colorantes quimioluminiscentes y fluoróforos cumplen la mayoría de estos requisitos y se han usado con éxito como marcas en los inmunoensayos. Los ejemplos de las enzimas comúnmente usadas son la peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, glucosa oxidasa, y beta-galactosidasa. La selección de la enzima para usarse como marca para los reactivos inmunoquímicos es a menudo empírica, y cada enzima tiene diferentes ventajas y desventajas. (Para las propiedades de las enzimas, vea el Capítulo 54.) Los radioisótopos pueden usarse para marcar ya sea los antígenos o los anticuerpos. El radioisótopo más comúnmente usado es el ^{125}I , que tiene una alta actividad específica y una energía de desintegración apropiada para su uso seguro en los laboratorios clínicos (ver el Capítulo 9).

En los inmunoensayos fluorimétricos, el antígeno o el anticuerpo pueden conjugarse o unirse covalentemente con una molécula fluorescente (fluorocromo). El fluorocromo es un compuesto que puede absorber energía electromagnética luminosa de longitud de onda corta (200 a 400 nm) y luego emitir la luz a una longitud de onda más larga en el espectro visible (400 a 700 nm. Ver pág. 98). La intensidad de la luz emitida es el indicador cuantificable en los inmunoensayos fluorimétricos. El fluorocromo más popular es el isotiocianato de fluoresceína, a menudo abreviado FITC, que puede conjugarse fácilmente con los grupos aminos libres; otros fluoróforos incluyen quelantes de tierras raras. Los colorantes quimioluminiscentes se usan de una manera similar. En este caso, el conjugado se activa mediante una reacción química y posteriormente emite la luz, la cual puede medirse. La molécula quimioluminiscente puede conjugarse directamente con la marca o un sustrato quimioluminiscente puede usarse con una marca enzimática como la fosfatasa alcalina.

Ensayos Inmunométricos

Principios

Anticuerpos marcados heterogéneos, no competitivos (técnica inmunométrica).

Un formato popular para este tipo de inmunoensayo es el inmunoensayo heterogéneo que usa una fase sólida recubierta con anticuerpo para el primer paso del ensayo. El primer



anticuerpo reacciona con el antígeno que se va a probar. El grado de esta reacción se evalúa mediante una reacción subsecuente con un segundo anticuerpo marcado. Éste forma el "sandwich" con el antígeno situado entre dos anticuerpos diferentes. La técnica del sandwich puede usarse para medir ya sea antígenos o anticuerpos (en este último caso la fase sólida se recubre con antígeno). Los anticuerpos se han inmovilizado en partículas de poliestireno (placas de microvaloración), látex, o ferromagnéticas.

Para el sistema de medición de antígeno, se deben unir al antígeno dos moléculas diferentes del anticuerpo. Por lo tanto, solo los antígenos grandes, como las proteínas con epítopes múltiples pueden medirse mediante este tipo de inmunoensayo (Fig. 12-13). El anticuerpo de la especificidad deseada se inmoviliza a una superficie sólida, que puede ser la de los pozos en una placa de microvaloración o a un tubo de ensayo de plástico. La superficie sólida se lava para eliminar todos los materiales que no reaccionaron y luego puede recubrirse con otro material (proteína) para reducir al mínimo las reacciones no específicas, con posibles resultados falsos positivos. En el segundo paso, el líquido que contiene el antígeno se hace reaccionar con el anticuerpo inmovilizado. Luego se remueve todo el material que no reaccionó. En el tercer paso, el anticuerpo marcado reacciona con el antígeno que ahora ha sido inmovilizado por el anticuerpo sobre la fase sólida. Luego se remueve todo el anticuerpo marcado que no reaccionó. Si la enzima se usa como la marca, se agrega el sustrato con los cofactores apropiados. Luego, se mide la cantidad de producto por desarrollo de color, fluorescencia, o luz. Pueden usarse mediciones ya sea de punto final o cinéticas. La intensidad del producto medido es directamente proporcional a la cantidad de antígeno unido a la fase sólida. Si un radioisótopo fue usado como la marca, puede contarse la radiactividad en la fase sólida.

Para un sistema que mide anticuerpos, el antígeno de interés debe inmovilizarse primero a una matriz insoluble, como una superficie plástica o una cuenta. Las placas de microvaloración se usan con mayor frecuencia. La Fig. 12-14 es un esquema de este tipo de valoración. La inmovilización con retención de la reactividad antigénica es el primer paso de este procedimiento. En el segundo paso, se permite reaccionar el líquido biológico que contiene el presunto anticuerpo dirigido contra el antígeno inmovilizado. Cualquier anticuerpo presente se unirá al antígeno inmovilizado en la fase sólida. Después de separar los componentes que no reaccionaron, mediante el lavado de la superficie del medio de soporte, se detecta la presencia del anticuerpo y se cuantifica mediante la adición de un anti-anticuerpo marcado que está dirigido contra la especificidad de la clase del anticuerpo que se está midiendo. Finalmente, se cuantifica la marca. Este formato se usa para medir IgE sérica que es específica para un alérgeno particular (prueba de RAST).

Para ambos tipos de ensayos de sandwich, el anticuerpo o el antígeno que recubre la fase sólida debe estar en exceso sobre el compuesto analizado que se está midiendo. Si la cantidad del antígeno presente excede la capacidad de unión de la molécula de captura inmovilizada en la fase sólida, el ensayo no será cuantitativo, produciendo el efecto denominado "anuelo de dosis alta". El anticuerpo marcado también debe estar presente en exceso sobre el compuesto analizado, que ya se unió para obtener una respuesta lineal y un ensayo cuantitativo.

Ensayos de unión competitiva heterogéneos.

El ensayo más sencillo de unión competitiva usa antígeno marcado (Fig. 12-15) y en el Capítulo 13 se presenta un tratamiento minucioso. Para el caso del inmunoensayo enzimático, el antígeno marcado con la enzima es mezclado con la solución de prueba, que contiene una

cantidad desconocida del antígeno. A la solución que contiene el antígeno marcado y el no marcado se deja reaccionar con una cantidad *limitada* de anticuerpo el cual está unido a una matriz sólida. El antígeno no unido (ambos, el marcado y el no marcado) se remueve por lavado, y la cantidad de antígeno marcado se mide determinando la cantidad de enzima unida a la superficie sólida. Este ensayo siempre se realiza en exceso de antígeno. La solución de prueba contiene el sustrato de la enzima y cofactores, y la reacción enzimática, que genera un producto de color, procede de manera continua. La intensidad de color es inversamente proporcional, pero no lineal, a la concentración del antígeno presente en la muestra de prueba. Este formato del inmunoensayo puede usarse para detectar pequeños antígenos o haptenos, incluidos los medicamentos y las hormonas como los esteroides y las hormonas tiroideas, en los fluidos biológicos.

Requisitos y preparación de la muestra.

Deben tomarse todas las precauciones requeridas para preservar los anticuerpos y el antígeno con inmunoensayos de indicador marcado. Muchas hormonas, compuestos analizados proteicos y anticuerpos son estables en suero por un tiempo corto a la temperatura del refrigerador. Para el almacenamiento a largo plazo, es preferible la congelación.

Es particularmente importante establecer y monitorear que el antígeno o el anticuerpo usado en un ensayo no se una inespecíficamente a la superficie del medio de soporte. Cualquier componente en la muestra que se pueda unir al anticuerpo de la fase sólida con la marca se medirá como el compuesto analizado. El factor reumatoide puede interferir de esta manera. Además, los sistemas que usan anticuerpos monoclonales de ratón como reactivos pueden mostrar una interferencia positiva en los pacientes que tienen anticuerpos heterólogo (antispecies) en su suero. Este problema se ha reportado en pacientes que han sido tratados con anticuerpos monoclonales de ratón para generación de imágenes con fines diagnósticos o terapia, y que posteriormente han desarrollado anticuerpos humanos anti-ratón.

Reactivos

Reactivos marcados.

Los reactivos de la prueba deben ser seleccionados de manera que el conjugado tenga alta actividad específica, en particular cuando la concentración del compuesto analizado de prueba es baja.

Fase sólida.

Las cuentas de plástico, látex, o magnéticas debe elegirse de tal manera que el reactivo unido ("captura") no sea removido por la solución de lavado en las condiciones del ensayo. Varios fabricantes han desarrollado placas de microvaloración de plástico y tubos de ensayo específicamente para los inmunoensayos enzimáticos.

Sustrato.

En el caso de las marcas enzimáticas, el sustrato específico puro apropiado para la enzima es seleccionado para maximizar la actividad catalítica de la enzima. Como en cualquier ensayo enzimático, se debe tener cuidado de agregar suficiente sustrato para que éste no se agote durante el tiempo de reacción estándar aún y cuando una cantidad grande de la enzima marcada esté unida a la fase sólida.

Soluciones amortiguadoras.

Se seleccionan soluciones amortiguadoras puras de la fuerza iónica apropiada, pH y composición para optimizar la detección de la enzima y las marcas quimioluminiscentes.



Instrumentación

Se usa generalmente un espectrofotómetro para medir los cambios de color que son resultado de la actividad enzimática. Con los instrumentos contemporáneos, este proceso puede automatizarse y las mediciones cinéticas son posibles. Cuando la reacción ocurre en las placas de microvaloración con volúmenes de reacción de 100 a 200 μL , se usan espectrofotómetros especiales llamados "lectores de microvaloración," o "lectores de microELISA". Un inconveniente para los lectores de microvaloración de placa, sin embargo, es que con frecuencia éstos no son tan sensibles como un espectrofotómetro estándar. Además, generalmente no son lectores de punto final. No obstante, muchos tienen la capacidad de registrar los resultados de una placa estándar de microvaloración de 96 pozos entre 1 y 2 minutos.

La instrumentación requerida para la medición de radioisótopos se presenta en el Capítulo 9. El radioisótopo más comúnmente usado, ^{125}I , requiere un contador gama. Se requiere instrumentación especializada para la medición de las marcas fluorescentes. Si se emplean quelantes de metales, puede usarse técnicas como la fluorescencia de resolución por tiempo (ver el Capítulo 4). Los fluoroinmunoensayos tanto los indirectos como los directos requieren un fluorómetro o espectrofotofluorómetro para obtener lecturas exactas del anticuerpo marcado con fluorocromo. Los luminómetros, o contadores de fotones, miden los destellos luminosos o el "brillo" emitido en los ensayos de quimioluminiscencia.

Sustancias interferentes

Las sustancias que constituyen la matriz de la muestra pueden interferir con la reacción de unión antígeno-anticuerpo o con la detección de la marca, o bien pueden simular la unión específica mediante el incremento de unión inespecífica o por entrecruzamiento de la marca con la fase sólida. Además, la muestra puede contener sustancias con actividad enzimática o que presenten fluorescencia bajo las condiciones del ensayo. Se debe tener cuidado de evitar el contacto con los compuestos que interfieren con la detección de la marca de la enzima, como los inhibidores o los reactivos oxidantes.

Problemas comunes

- 1 El almacenamiento inadecuado de los reactivos inmunoquímicos. Se debe tener cuidado de preservar la actividad enzimática o radioisotópica de los reactivos marcados.
- 2 Material plástico inapropiado usado en las placas de microvaloración o los tubos de ensayo. Este no es un problema común cuando se usan los estuches pero se debe considerar cuando se desarrollan nuevos ensayos. Los cambios de lotes, aun del mismo proveedor, ocasionalmente dan lugar a un bajo desempeño debido a los cambios en las propiedades del soporte plástico.
- 3 pH indebido y fuerza iónica del amortiguador.
- 4 Adsorción inespecífica de los reactivos a la superficie plástica. Esta adsorción inespecífica puede ser reducida al mínimo por incubación de la fase sólida con material proteico, como la gelatina o la albúmina sérica bovina, después de la adsorción inicial del reactivo de captura a la fase sólida.
- 5 Control inadecuado de las condiciones experimentales. La precisión de los inmunoensayos



enzimáticos depende del control estricto de la temperatura, el pH, la fuerza iónica de los amortiguadores, y las concentraciones de los diversos cofactores necesarios para la conversión enzimática del sustrato en el producto. Finalmente, ya que las enzimas son proteínas y están sujetas a desnaturalización rápida en condiciones inadecuadas de incubación, debe tenerse mucho cuidado de preservar la actividad enzimática durante el análisis.

- 6 Agotamiento del sustrato. Si una gran cantidad del reactivo marcado por enzima es capturado en la matriz sólida, el sustrato puede agotarse muy rápidamente. Debe incluirse suficiente sustrato en la mezcla de reacción para tener disponible un rango adecuado de trabajo y los límites superiores de linealidad deben definirse cuidadosamente.

Sensibilidad y precisión de la prueba

Se describen numerosos formatos para el desempeño de los inmunoensayos marcados por indicador. La sensibilidad y la precisión de cada uno de estos inmunoensayos dependen del formato seleccionado y de la instrumentación usada para medir la marca. Se considera en general que los inmunoensayos enzimáticos y las técnicas radioinmunológicas son sensibles en el rango de nanogramos a picogramos/mL. Actualmente, la mayoría de los inmunoensayos enzimáticos o técnicas radioinmunológicas disponibles tienen un coeficiente de variación de menos de 10% en el rango de trabajo del ensayo. Los fluoroinmunoensayos pueden tener menor sensibilidad (cerca de 100 a 200 $\mu\text{g/mL}$), pero los formatos más recientes, incluidos los fluoroinmunoensayos de resolución por tiempo, son tan sensibles como la mayoría de los EIA o RIA. La variación observada dentro de la misma corrida es típicamente de 3% a 6%. La sensibilidad del inmunoensayo depende de marcas con alta actividad específica, baja unión inespecífica y excelente precisión.

Resumen

En este capítulo se describen muchas técnicas inmunológicas y se resumen en la Tabla 12-1. Cada uno de estos procedimientos se desarrolló para satisfacer una necesidad específica a fin de identificar o cuantificar un antígeno presente en la muestra del paciente. Las técnicas de inmunoprecipitación son las menos sensibles pero tienen alta especificidad para determinar la presencia de un antígeno dentro del rango de trabajo del ensayo. La inmunonefelometría es el más sensible de los ensayos cuantitativos que usan la precipitación como punto final y está convirtiéndose rápidamente en la forma más popular de ensayo cuantitativo para muchas proteínas de suero y líquido cefalorraquídeo. Los adelantos recientes en la instrumentación han hecho de esta técnica la más precisa de las técnicas inmunológicas directas, y se prefiere sobre la inmunodifusión radial y la inmunoelectroforesis de cohete. Las técnicas de la inmunoelectroforesis y transferencia Western son herramientas estrictamente cualitativas. Estas se emplean comúnmente para evaluar la calidad de un antígeno presente en la muestra de un paciente, como la IgG policlonal frente a una proteína monoclonal, o la degradación de C3 frente a la forma nativa de C3. La técnica de transferencia de Western se usa comúnmente para la comprobación de la presencia del anticuerpo contra un antígeno específico, como el VIH.

La aglutinación y las técnicas de fijación de complemento son los procedimientos usados



principalmente en serología y en laboratorios de los bancos de sangre.

Los inmunoensayos de indicador marcado se están volviendo cada vez más populares en el laboratorio clínico como herramientas cuantitativas a medida que incrementan la sensibilidad y la especificidad para la detección de antígenos. Los inmunoensayos enzimáticos son los inmunoensayos usados con mayor frecuencia por las razones anteriormente citadas. Hay muchos formatos de ensayos, y numerosos estuches están disponibles comercialmente para medir las cantidades muy pequeñas de proteínas séricas, hormonas y medicamentos.

La selección de la técnica inmunológica apropiada para la detección de un antígeno en el laboratorio depende de muchas variables: las aptitudes del analista, instrumentación, volumen de pruebas y el tiempo de retorno deseado, la disponibilidad de la prueba en forma estuche, la disponibilidad del control de calidad de la muestra, la facilidad de la técnica y el costo para realizar el ensayo. Cualquiera que sea el formato de ensayo seleccionado, los factores cruciales que deben considerarse son la especificidad del reactivo anticuerpo, la estructura del antígeno y la preservación de la muestra.

Bibliografía

General

- Butt WR, editor: *Practical immunoassay: the state of the art*, New York, 1984, Marcel Dekker.
- Chan D, Perlstein MT, editors: *Immunoassay: a practical guide*, Orlando, Fla., 1986, Academic Press.
- Gosling JP: A decade of development in immunoassay methodology, *Clin Chem* 36(8):1408-1427, 1990.
- Nakamura RM, Kasahara Y, Rechnitz GA, editors: *Immunochemical assays and biosensor technology for the 1990's*, Washington, D.C., 1992, American Society for Microbiology.
- Roitt IM, Brostoff J, Male DK: *Immunology*, London, 1985, Gower Medical Publishing.
- Roitt IM: *Essential immunology*, ed 6, Oxford, England, 1988, Blackwell Scientific Publications.
- Rose NR, Friedman H, Fahey J, editors: *Manual of clinical immunology*, ed 3, New York, 1986, American Society of Microbiology.
- Stites DP, Stobo JD, Wells JV, editors: *Basic and clinical immunology*, ed 6, Norwalk, Conn., 1987, Appleton & Lange.
- Weir DM, editor: *Handbook of experimental immunology*, ed 4, Oxford, England, 1986, Blackwell Scientific Publications.

Inmunodifusión

- Ouchterlony O: *Handbook of immunodiffusion and immunoelectrophoresis*, Ann Arbor, Mich., 1986, Ann Arbor Science Publishers.

Immunolectroforesis

- Keren DF: *High resolution electrophoresis and immunofixation*, ed 2, Boston, 1994, Butterworth.

Immunolectroforesis bidimensional

- Dunbar BS: *Two-dimensional electrophoresis and immunological techniques*, New York, 1987, Plenum Publishing.

Inmunodifusión radial

- Fahey JL, McKelney E: Quantitative determination of serum immunoglobulins in antibody-agar plates, *J Immunol* 94:84, 1965.
- Mancini G, Vaerman JP, Carbonara AD, Heremans JF: A single radial immunodiffusion method for the



immunological quantitation of proteins. In Peeters H, editor: *Protides of the biological fluid*, 11th colloquium, Amsterdam, 1964, Elsevier Publishing Co.

Ritzman SE, Fisher CL, Nakamura RM: Quantitative immunochemical procedures. In Ritzman SE, Daniels JC, editors: *Serum protein abnormalities: diagnostic and clinical aspects*, Boston, 1975, Little, Brown & Co.

Immunoelectrophoresis Laurell ("cohete")

Laurell CB: Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies, *Ann Biochem* 15:45, 1966.

Nefelometría

Ritchie RF: The maturation of light-scattering immunoassay. In Nakamura RM, Kasahara Y, Rechnitz GA, editors: *Immunochemical assays and biosensor technology for the 1990s*, Washington, D.C., 1992, American Society for Microbiology.

Whitcher JT, Perry DE: Nephelometric methods. In Nakamura RM, Kasahara Y, Rechnitz GA, editors: *Immunochemical assays and biosensor technology for the 1990s*, Washington, D.C., 1992, American Society for Microbiology.

Inmunonefelometría

Price CP, Spencer K, Whitcher JT: Light scattering immunoassays of specific proteins: a review, *Ann Clin Biochem* 20:1-14, 1983.

Nishikawa T, Kubo H, Saito M: Competitive nephelometric immunoassay methods for antiepileptic drugs in patient blood, *J Immunol Methods* 29:85, 1979.

Aglutinación

Bell CA, editor: *A seminar on antigen-antibody reaction revisited*, Washington, D.C., 1982, American Association of Blood Banks.

Kasahara Y: Principles and applications of particle immunoassay. In Nakamura RM, Kasahara Y, Rechnitz GA, editors: *Immunochemical assays and biosensor technology for the 1990s*, Washington, D.C., 1992, American Society for Microbiology.

Lennette EH, Valows A, Hausler WJ Jr, Truant JP, editors: *Manual of clinical microbiology*, ed 3, New York, 1980, American Society for Microbiology.

Williams CA, Chase MW: *Methods in immunology and immunochemistry*; vol 3, *Reactions of antibodies with soluble antigens*; vol 4, *Agglutination, complement, neutralization and inhibition*, New York, 1977, Academic Press.

Fijación de complemento

Stansfield WD: *Serology and immunology*, New York, 1981, McMillan.

Fluoroimmunoanálisis

Hemmilä L: Fluoroimmunoassays and immunofluorometric assays, *Clin Chem* 31:359-375, 1985.

Inmunoeanálisis enzimáticos

Avrameas S, Nakane PK, Papamichael M, Pesce AJ, editors: 25 years of enzyme immunoassay, *J Immunol Methods*, vol 150, no 1 and 2, 1992.

Engvall E, Perlmann P: Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA): quantitative assay of immunoglobulin G, *Immunochemistry* 8:871, 1971.

Kemeny DM, Chaldacombe SJ: *ELISA and other solid phase immunoassays*, New York, 1988, Wiley & Sons.



Tablas

Tabla 12-1.

Tabla 12-1 Resumen de las técnicas inmunológicas*

Técnica	Ensayo del punto final	Equipo necesario	Sensibilidad del ensayo	Tiempo requerido para resultados
Inmunodifusión (Ouchterlony)	Precipitación (cualitativa)	Plantilla para agar	45 µg/mL	8-72 horas
Inmunoelectroforesis	Precipitación (cualitativa)	Plantilla para agar Tanques de buffer Electrodos Fuente de poder	500 µg/mL	12-24 horas
Contrainmunoelectroforesis	Precipitación (cualitativa)	Plantillas para agar Tanques de buffer Electrodos Fuente de poder	3 µg/mL	2-3 horas
Inmunoelectroforesis bidimensional	Precipitación (cualitativa)	Tanques de buffer Bloques de enfriamiento Electrodos Fuente de poder	500 µg/mL	8-10 horas
Inmunodifusión radial (Mancini)	Precipitación (cuantitativa) CV, 10%-15%	Dispositivo calibrado para medir diámetro de precipitación Papel milimetrado	50 µg/mL	12-24 horas
Inmunoelectroforesis "rocket" de Laurell	Precipitación (cuantitativa) CV, 8%-12%	Tanques de buffer Electrodos Fuente de poder Dispositivo calibrado para medir altura del cono Papel semilogarítmico	50 µg/mL	4-8 horas
Inmunoelectrometría	Agregados dispersantes antígeno-anticuerpo (cuantitativa) CV, 3%-8%	El nefelómetro debe estar equipado con minicomputadora si se mide velocidad de formación de agregados dispersantes	1 µg/mL	½ o 1 hora
Aglutinación directa e indirecta	Aglutinación de bacterias o eritrocitos que contienen antígeno (semicuantitativa)	Ninguno	15 µg/mL	1-5 minutos



Inhibición de aglutinación	Inhibición de aglutinación (semicuantitativa)	Ninguno	15 µg/mL	2-5 minutos
Imunodifusión (Ouchterlony)	Pecipitación (cualitativa)	Plantilla para agar	45 µg/mL	2-4 horas
Fijación de complemento	Lisis o inhibición de lisis de eritrocitos (semicuantitativa)	Espectrofotómetro Papel milimetrado	10 µg/mL	
Fluoroinmunoanálisis (directo o indirecto)	Intensidad de fluorescencia de reactivo anticuerpo marcado (cuantitativo) CV, 5%-10%	Fluorómetro Papel milimetrado	100 ng/mL	1-2 horas
Enzimoinmunoanálisis (ELISA, sándwich)	Reacción de color entre enzima y sustrato (cuantitativo) CV, 8%-15%	Espectrofotómetro o placa de microtitulación Lector de ELISA Papel milimetrado Placas de microtitulación	1 ng/mL	1-24 horas
Enzimoinmunoanálisis (unión competitiva)	Reacción de color entre enzima y sustrato (cuantitativo) CV, 8%-15%	Placas de microtitulación Espectrofotómetro o placa de microtitulación Lector de ELISA Papel milimetrado o microcomputadora	1 ng/mL	2-4 horas

* Abreviaturas: LCR, Líquido cefalorraquídeo; CV, coeficiente de variación; GCh, gonadotrofina coriónica humana.

Figuras

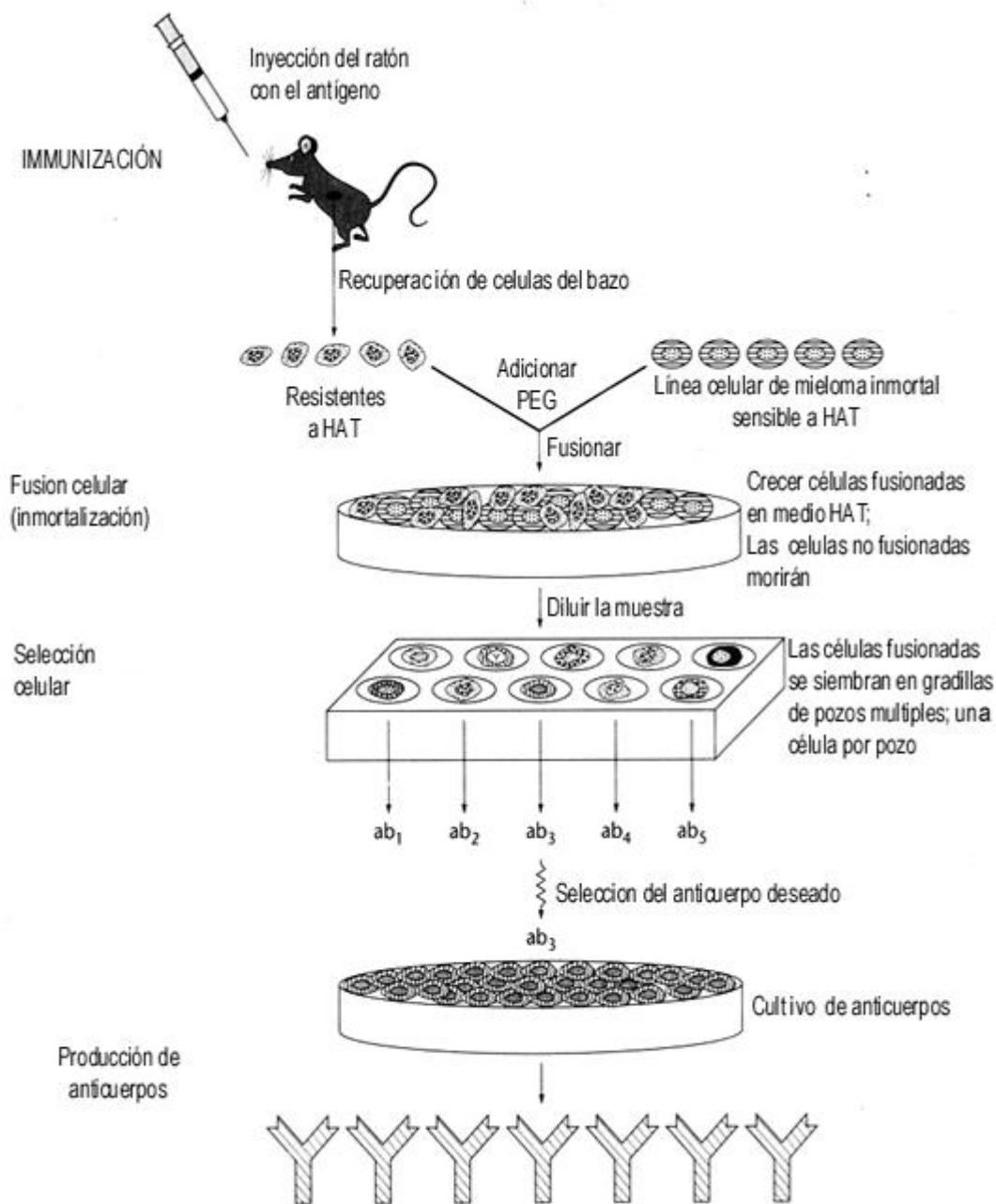
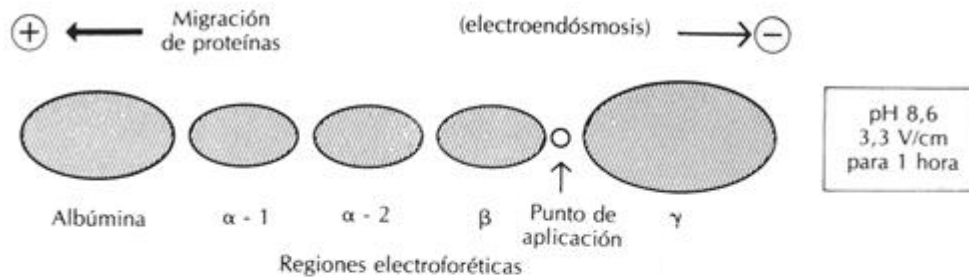


Figura 12-1 Producción de anticuerpos monoclonales. La producción de anticuerpos se inicia por inmunización de un animal con el antígeno. Después de la respuesta inmune, se aíslan las células del bazo, cada una de las cuales produce un anticuerpo único. Estas células se fusionan con una línea celular inmortal de mieloma por exposición a polietilén glicol (PEG). Las células de mieloma que no se fusionaron en el medio de cultivo que contiene HAT (una mezcla de hipoxantina, aminopterina y timidina) no pueden resolver el bloqueo metabólico causado por aminopterina y por lo tanto perecen. Las células de bazo no fusionadas también mueren en forma natural después de 1 a 2 semanas. Las células fusionadas sobreviven conservando la inmortalidad de las células de mieloma y las resistencia a HAT de las células del bazo. Después, las células fusionadas se cultivan

a una dilución alta y se seleccionan por la secreción de anticuerpos con las características deseadas. Finalmente, un cultivo de células secretoras de anticuerpos derivadas de una sola célula del bazo produce cantidades suficientes de anticuerpo monoclonal para análisis.

Etapa 1 - Separación de proteínas por electroforesis



Etapa 2 - Inmunodifusión

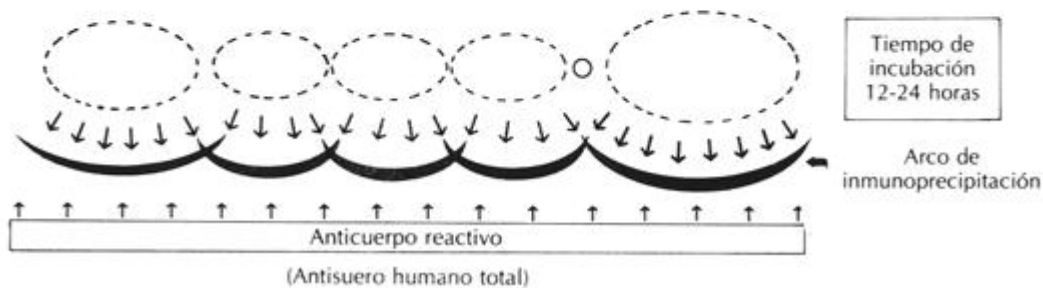


Figura 12-2 Técnica de inmunolectroforesis que utiliza suero humano normal y antisuero humano total. Usualmente se pueden observar más de cinco arcos de inmunoprecipitinas.

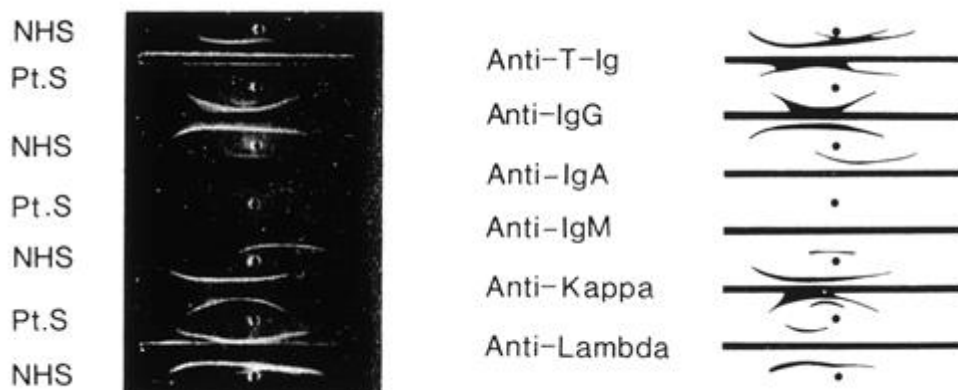


Figura 12-3 Ejemplos de patrones inmunolectroforéticos. *Izquierda*, fotografía del gel. *Derecha*, esquema dibujado de la fotografía. NHS, Suero humano normal; Pt.S, suero de

un paciente con IgG (K) de mieloma; *Anti-T-Ig*, antisuero contra todas (total) las inmunoglobulinas humanas; *Anti-IgG*, antisuero contra inmunoglobulinas humanas.

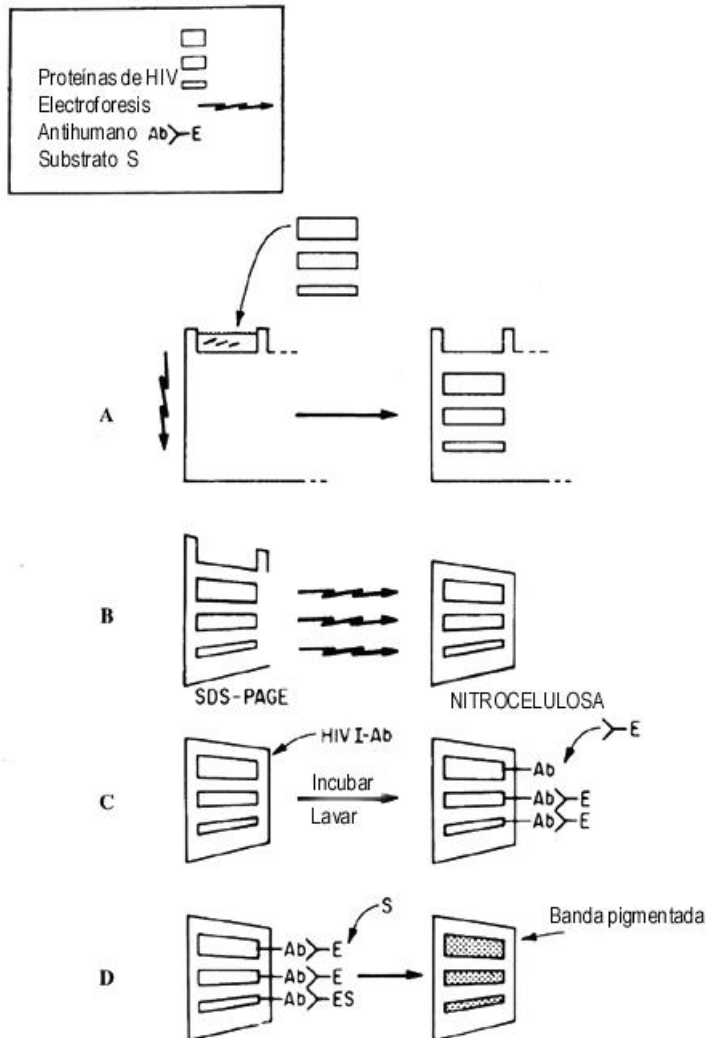


Figura 12-4 Diagrama de la técnica de inmunoelectrotransferencia de mancha unida a una enzima (western blot). *A*, Las proteínas HIV-1 se aplican en un en un SDS-PAGE, se someten a electroforesis y se separan de acuerdo a su peso molecular. *B*, Las bandas de proteínas se transfieren por electroforesis a una matriz de nitrocelulosa (blotted) y se incuban, primero con un espécimen conteniendo anticuerpo (ab) contra HIV-1, que se une individualmente a las bandas HIV-1 Ag. *C*, Entonces se adiciona el anticuerpo antihumano marcado Ab-E. Después se lava el exceso y se agrega el substrato. *D*, Aparece HIV-1 Ab dirigido contra las bandas individuales del antígeno HIV-1. Estas bandas individuales se pueden visualizar como bandas pigmentadas. (De *American Clinic Products Review* 6(11):16, 1987, International Scientific Communications. Inc.)

Etapa 1 - Electroforesis de antígeno en agarosa que contiene anticuerpo

Etapa 2 - Interpretación de resultados

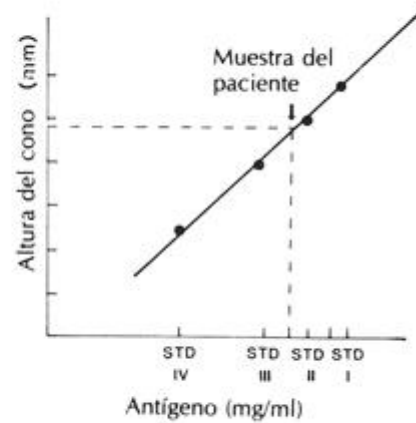
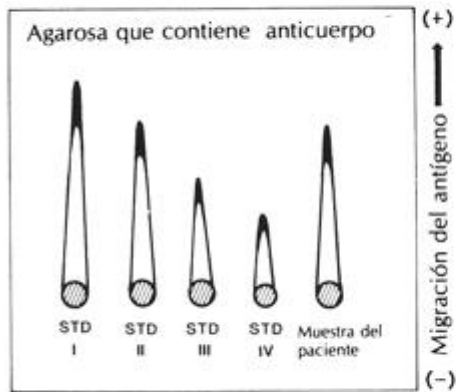


Fig. 10-6. Inmunoelectroforesis "rocket". STD, estándar.

Figura 12-5 Inmunoelectroforesis "Rocket". STD, Estándar.

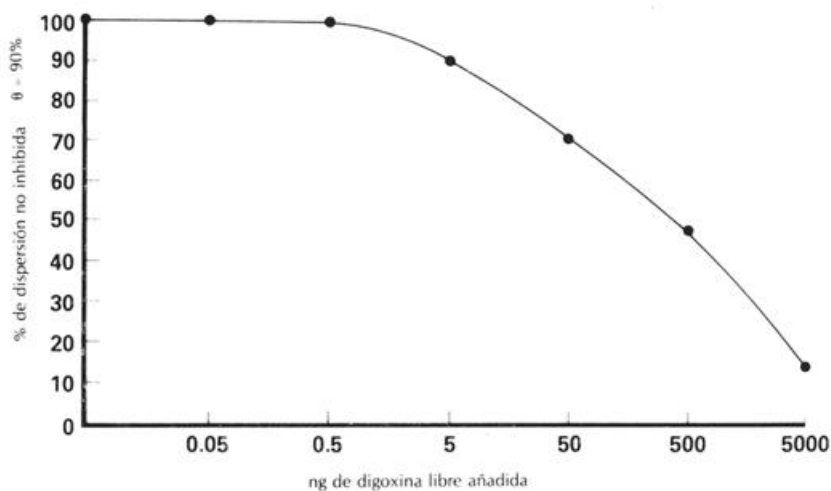


Figura 12-6 Curva estándar de digoxina utilizando un ensayo de inhibición nefelométrica.

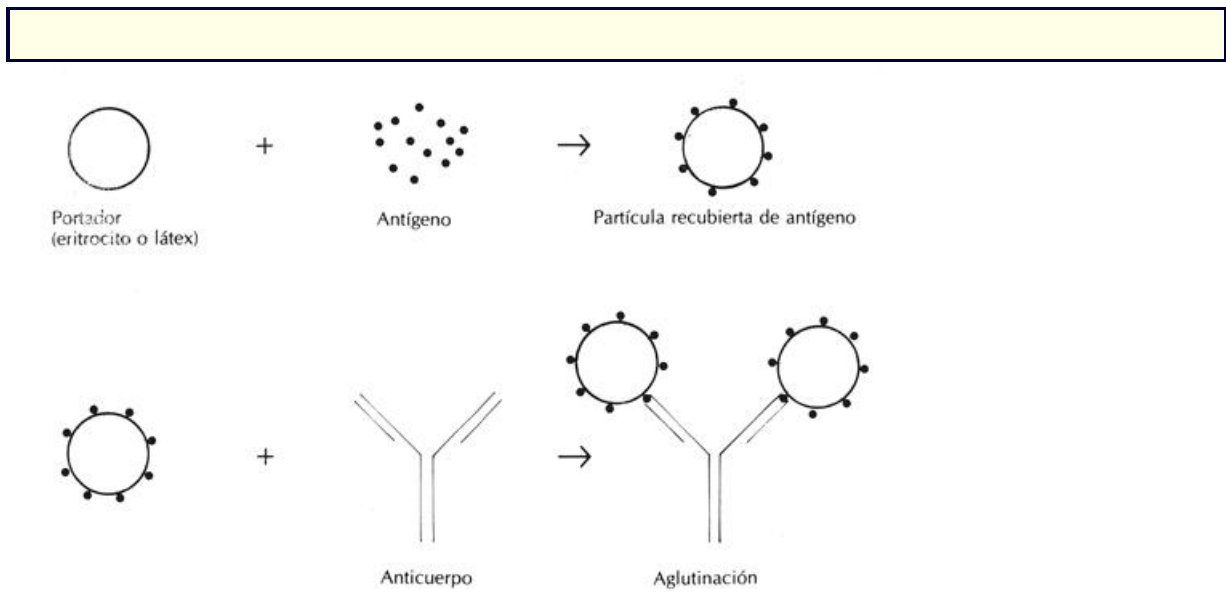


Figura 12-7 Reacción de aglutinación pasiva (indirecta). El antígeno se adsorbe en la superficie de la partícula acarreadora, la cual después es aglutinada por el anticuerpo antígeno específico.

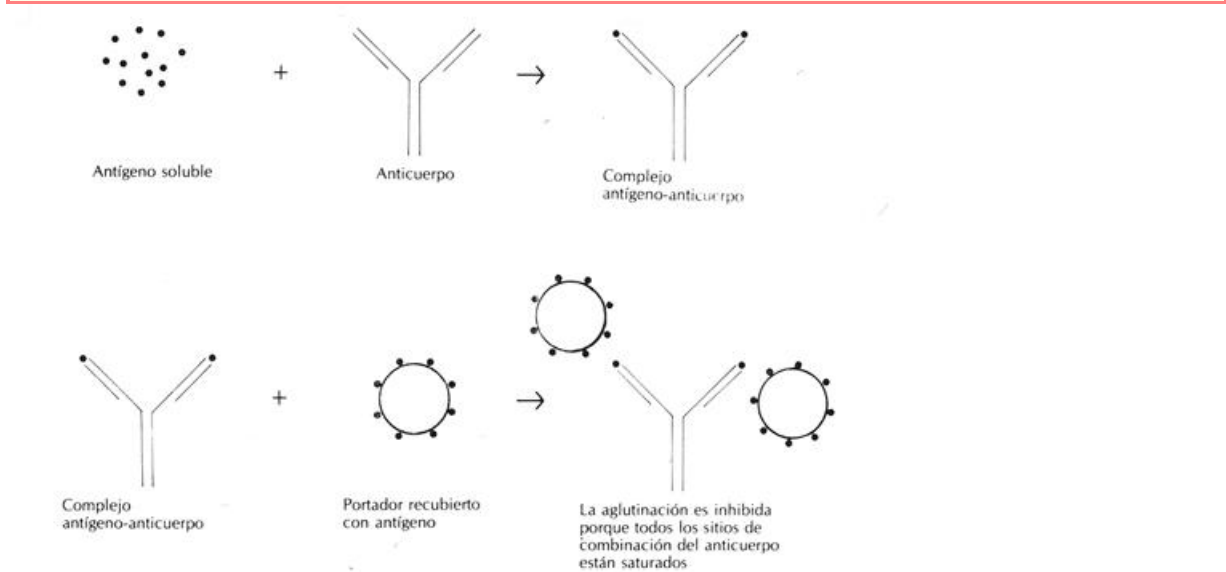


Figura 12-8. Reacción de aglutinación pasiva (indirecta). El antígeno se adsorbe en la superficie de la partícula acarreadora, la cual después es aglutinada por el anticuerpo específico para el antígeno.

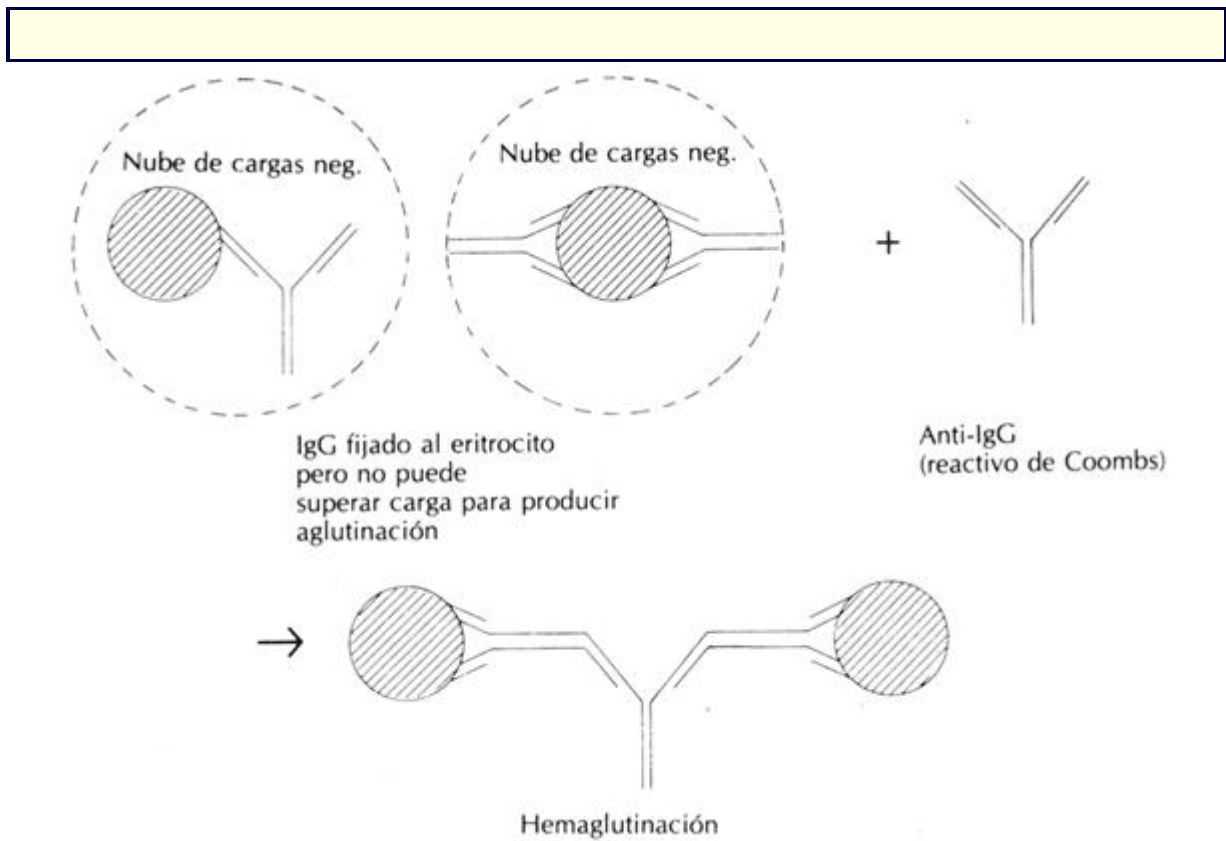


Figura 12-9 Prueba directa de Coombs para anticuerpos contra células eritrocíticas (GR).

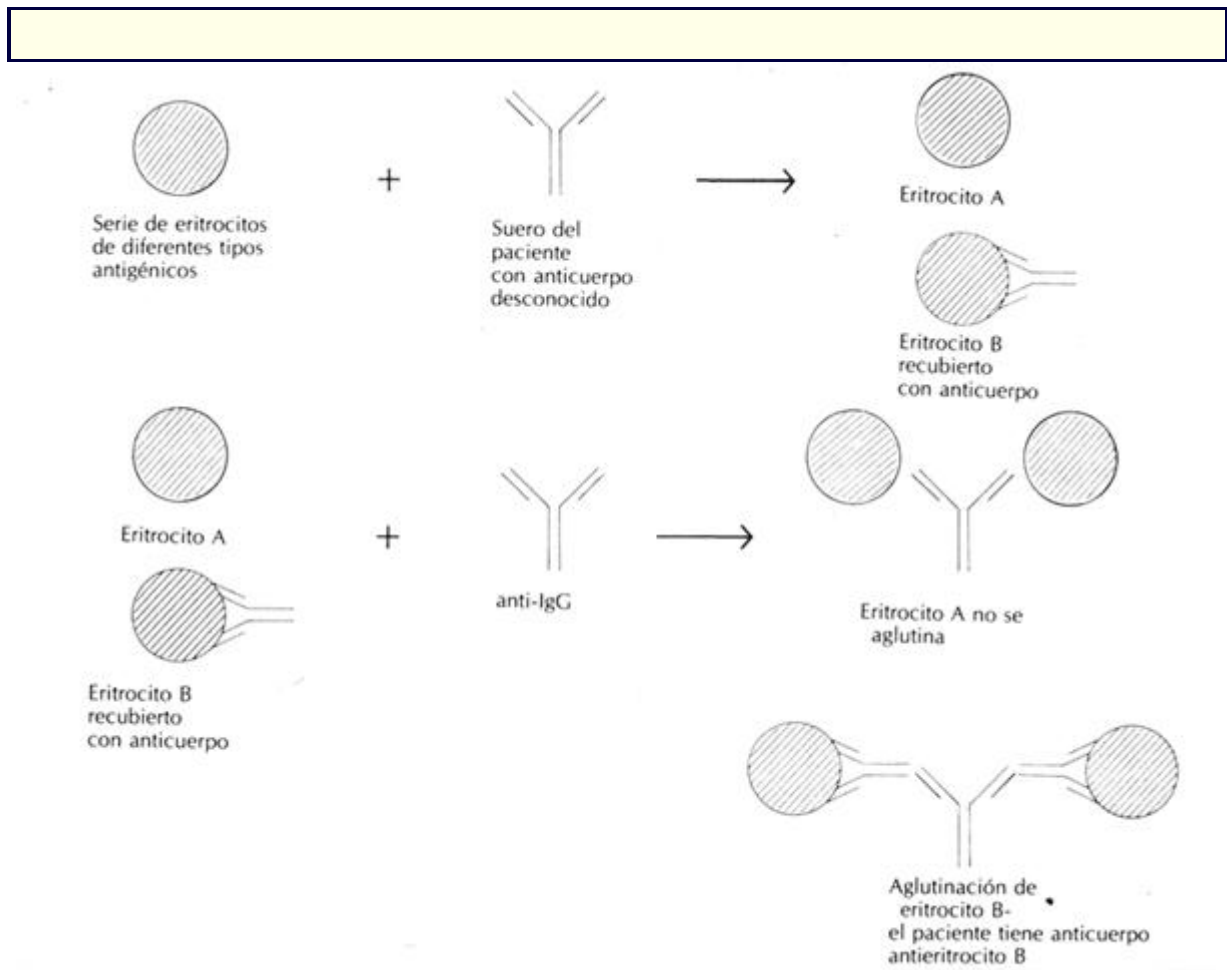


Figura 12-10 Prueba indirecta de Coombs para el anticuerpo.

Prueba indirecta de Coombs para el anticuerpo.

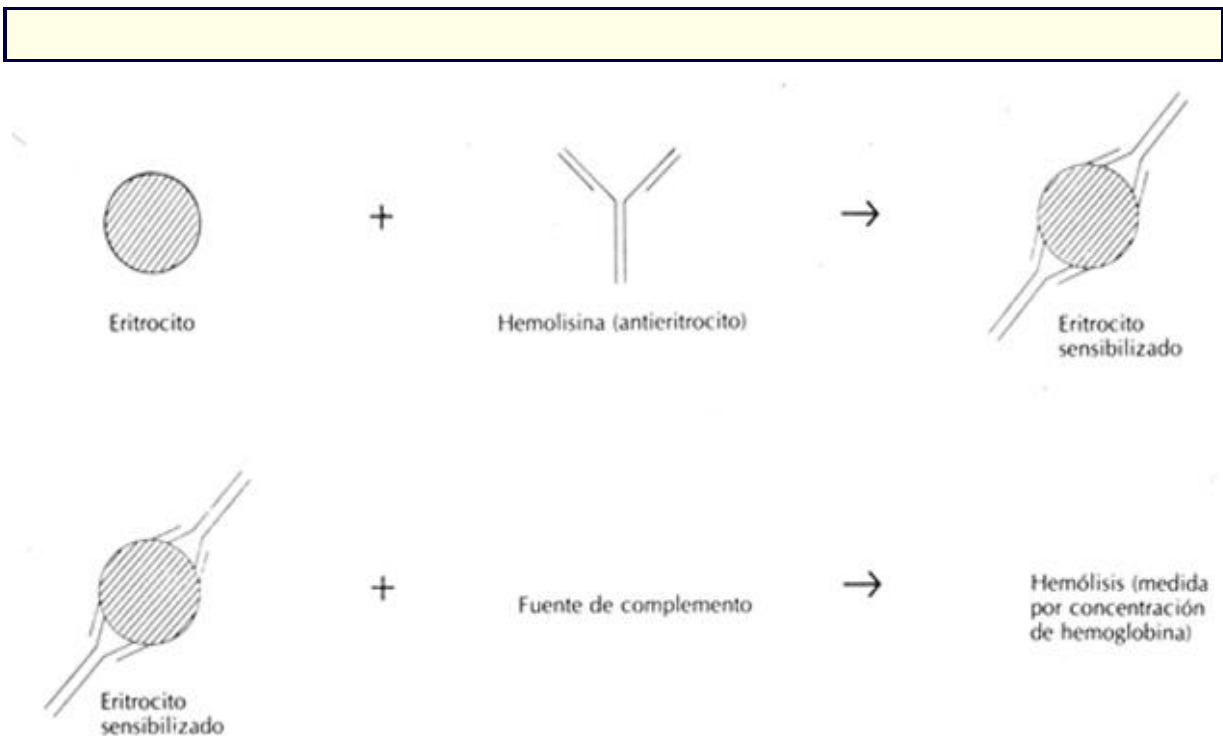


Figura 12-11 Prueba de fijación de complemento de una sola etapa. El suero de prueba se adiciona como fuente de complemento para la medición de complemento hemolítico total. Para la medición de los componentes del complemento como fuente de complemento, se utilizan los sueros de prueba, a los que se adicionan componentes del complemento purificados; por ejemplo, para medir el componente del complemento 3, se agregan todos los componentes, excepto C3, en exceso al suero de prueba. Consecuentemente, la reacción está limitada solamente por la concentración de C3 en el suero de prueba.

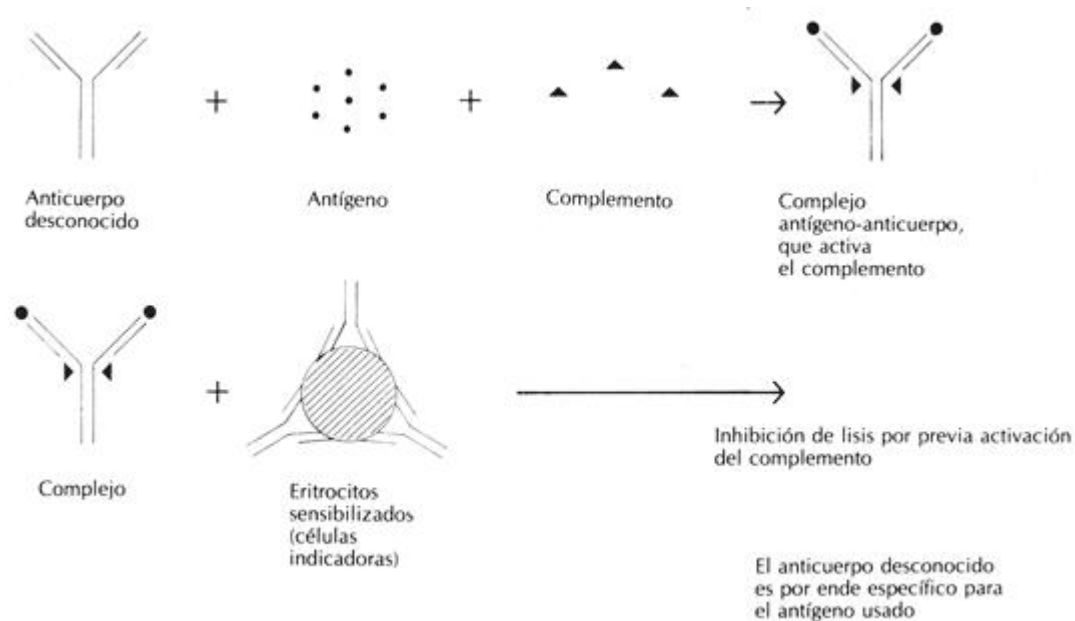


Figura 12-12 Prueba de fijación del complemento de dos etapas. Se puede medir el antígeno o el anticuerpo manteniendo constante todo excepto la variable que se va probar, en este caso un anticuerpo desconocido.

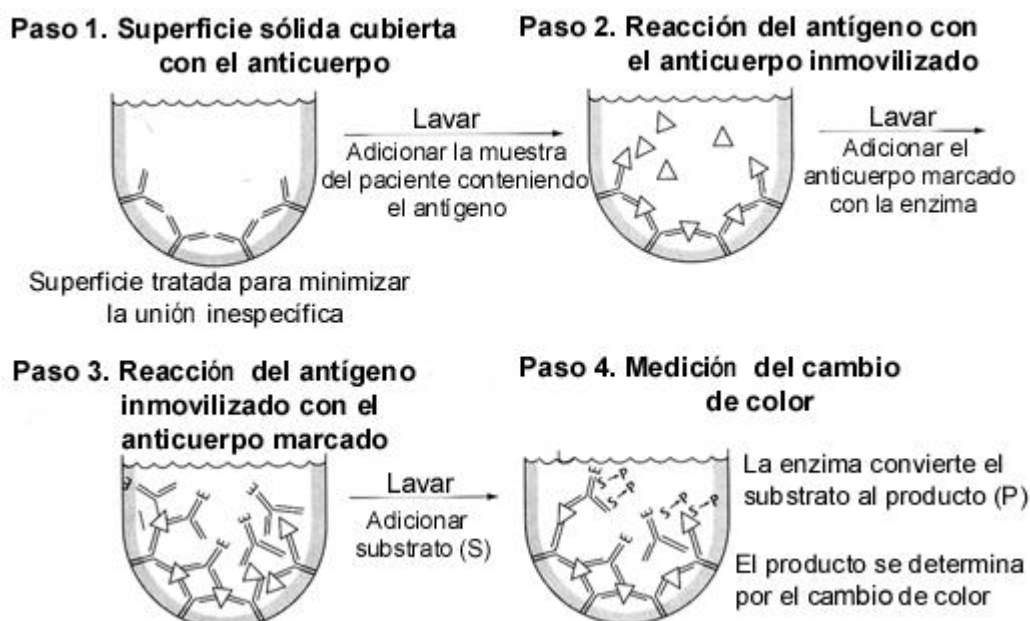


Figura 12-13 Inmunoensayo enzimático. Técnica de sandwich con el anticuerpo marcado.

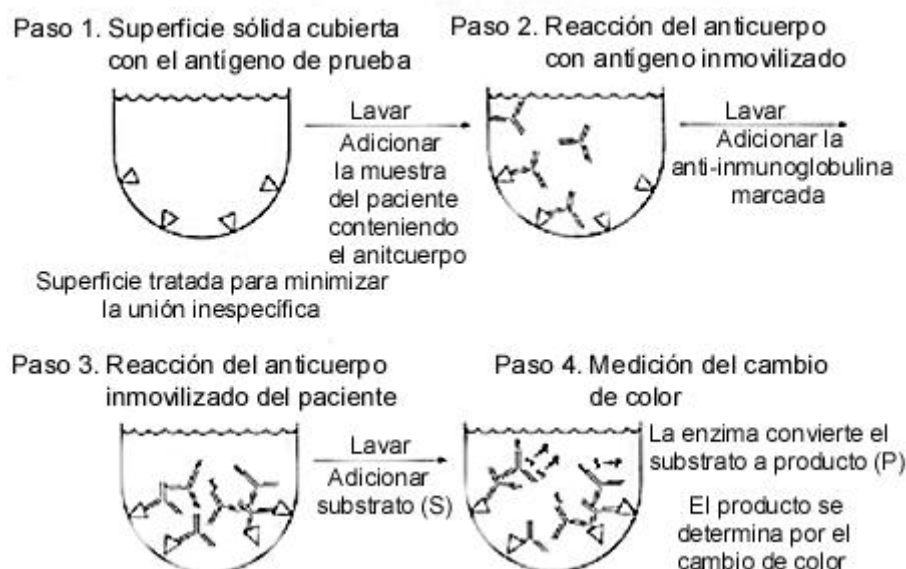


Figura 12-14 Inmunoensayo enzimático. Detección de IgE específica para un alérgeno.

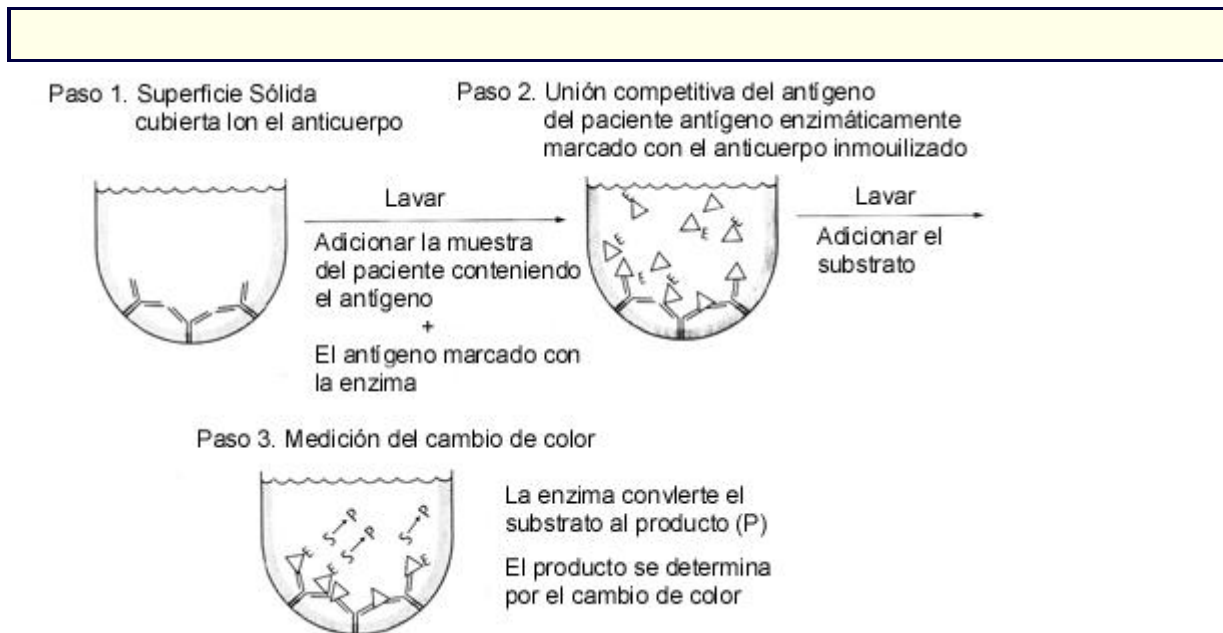


Figura 12-15 Inmunoensayo enzimático. Unión competitiva.

CAPÍTULO 13

13. Principios de los Ensayos de Unión Competitiva

Stephan G. Thompson

Unión de proteínas y la ley de la acción de masas

Comportamiento de los inmunoensayos de unión competitiva

Formatos de ensayo de unión competitiva

Ensayos heterogéneos

Inmunoensayos homogéneos

Ligandos marcados

Tipos de marcas

Factores que determinan la elección de la marca

Otras marcas

Límites de detección (sensibilidad)

Reactividad cruzada (especificidad)

Reducción de datos



Ejemplos de los ensayos de unión competitiva

Radioinmunoanálisis (RIA)

Ensayo inmunoabsorbente por unión a proteína

Ensayo de fluorescencia resuelta por tiempo

Técnicas de ensayos homogéneos

Inmunoensayo enzimático homogéneo

Sistema de inmunoensayo de reactivación por apoenzima

Inmunoensayo de polarización de fluorescencia

Inmunocromatografía

Inmunoensayos basados en micropartículas que dispersan la luz

Atributos y limitaciones de diferentes enfoques usados en los ensayos de unión competitiva

Términos clave

conjugado Generalmente se refiere al reactivo marcado en qué el ligando (antígeno) o el anticuerpo está covalentemente unido a la marca.

ensayo de unión competitiva Un procedimiento analítico basado en la unión reversible de un ligando a una proteína de unión. El ligando compite en proporción a su concentración con un derivado marcado para unirse al número limitado de los sitios de unión.

ensayo heterogéneo Una ensayo de unión competitiva en el cual es necesario separar mecánicamente la proteína unida y el ligando marcado del no marcado antes de medir la señal generada por la marca.

ensayo homogéneo Ensayo de unión competitiva en el cual no es necesario separar las fracciones de proteína unida y ligando libre, porque la señal de la marca es modulada por la proteína de unión.

ensayo inmunoenzimático (ELISA) Un inmunoensayo heterogéneo que utiliza en una configuración un ligando marcado enzimáticamente y un anticuerpo inmovilizado en una fase sólida.

ensayo inmunométrico Ensayos de unión a proteína competitivos y no competitivos en los cuales se marca el anticuerpo en lugar del ligando con un radioisótopo u otra marca apropiada.

especificidad El grado en que la proteína de unión se une a su ligando particular, pero no a compuestos estructuralmente similares.

fase de captura El ligando o la proteína de unión específica adherida a una superficie sólida o matriz para ayudar a separar la marca unida de la libre en un ensayo heterogéneo.

fluorescencia resuelta por tiempo o tardía Fluorescencia de larga duración emitida los quelatos de metales lantánidos como el eurpio y el terbio. También es caracterizada por su rendimiento y su gran desplazamiento de Stokes.

fluorógeno Una molécula no fluorescente que se torna fluorescente cuando es modificada por un proceso químico o enzimático.

grupo prostético Componentes no proteicos de las enzimas así como otras proteínas funcionales que se requieren para la actividad funcional de la proteína.



inmunoensayo Cualquier ensayo de unión en el cual la proteína de unión es un anticuerpo.

inmunoensayo del donador enzimático clonado (IDEC) Un inmunoensayo homogéneo en qué un ligando de bajo peso molecular se marca con un fragmento genéticamente clonado (donador enzimático) de β -galactosidasa. La porción restante de la molécula, el aceptor de la enzima complementaria, es inactiva a menos que los dos componentes puedan combinarse para generar una enzima activa. En el ensayo, esta combinación es inhibida por el anticuerpo contra el complejo ligando-donador enzimático. La inhibición es contrarrestada de una manera dependiente de la dosis si el ligando de prueba está presente en la solución.

inmunoensayo de fluorescencia (FIA) Los ensayos de unión competitiva que emplean un fluoróforo o fluorógeno como la marca.

inmunógeno Una sustancia que estimula una respuesta de anticuerpos cuando se administra a un animal apropiado. Los inmunógenos incluyen antígenos macromoleculares y diversos haptenos no antigénicos acoplados a un acarreador macromolecular.

ligando Una molécula o parte de una molécula que está unida reversiblemente por la proteína de unión en un ensayo de unión competitiva. Generalmente es el compuesto analizado pero también puede ser un reactivo cruzado.

límite de detección La concentración más pequeña de un ligando que puede distinguirse estadísticamente del nivel cero en un ensayo. El límite de detección también se conoce como la sensibilidad de un ensayo.

marca Un átomo o una molécula unido a la proteína de unión, capaz de generar una señal que se usa para monitorear la reacción de unión.

reactividad cruzada En los ensayos de unión competitiva, este término es sinónimo de la especificidad, o sea, la especificidad de la proteína de unión para unirse únicamente al ligando en contraste a otras sustancias.

sensibilidad El grado de respuesta a un cambio en la concentración del ligando en un ensayo. La sensibilidad también se refiere al límite de detección y es considerada un sinónimo de éste.

sistema de inmunoensayo por reactivación de apoenzima (SIRA) Un inmunoensayo homogéneo en qué un ligando marcado con un grupo prostético de la enzima se combina con la apoenzima para activar el complejo. Esta interacción es inhibida por un anticuerpo antiligando específico que a su vez es competitivamente desplazado con ligando no marcado.

sustratos luminogénicos Sustratos enzimáticos que emiten luz al hidrolizarse. La emisión de luz es un destello rápido (de 5 a 10 segundos) o un "brillo" de larga duración donde la emisión se mide hasta 2 horas después que inició la reacción.

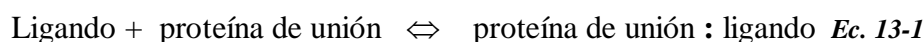
técnica de inmunoensayo amplificado por enzima (TIAE) Un inmunoensayo enzimático homogéneo en el cual un ligando de bajo peso molecular se adhiere a una enzima que está inhibida cuando el conjugado está unido mediante un anticuerpo específico. La unión competitiva del ligando no marcado reduce la inhibición en proporción a la concentración de ligando.

Unión a Proteínas y la Ley de Acción de Masas

Los ensayos de unión competitiva se basan en la unión reversible no covalente de un ligando a



una proteína de unión específica. El ensayo de unión se describe con mayor frecuencia mediante la siguiente reacción:



donde la proteína de unión posee una afinidad cuantificable para el ligando que interactúa con ella. En general, solo una proteína de unión puede unirse a una molécula pequeña. Esta reacción puede considerarse de forma simplificada como la reacción de una molécula ligando con un sitio de la proteína de unión. La característica molecular importante de las proteínas unión que les permite usarse en los ensayos cuantitativos es su capacidad de unirse a los compuestos con una alta especificidad y afinidad (ver Capítulos 11 y 12). Algunos ejemplos de proteínas de unión específicas se enumeran en la Tabla 13-1.

Casi todos los métodos de unión competitiva usan anticuerpos como la proteína de unión para moléculas pequeñas. Estas son generalmente gamma inmunoglobulinas (IgG) generadas directamente en animales mediante una respuesta celular a la inmunización con el ligando o son producidas por las técnicas de hibridomas de anticuerpos monoclonales con células derivadas de una célula original secretora de anticuerpos. Estos métodos se tratan con gran detalle en los Capítulos 11 y 12, así como en otras fuentes enumeradas en la bibliografía al final de este capítulo.

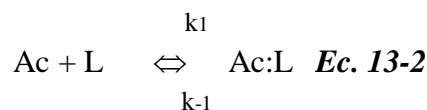
Normalmente, las moléculas pequeñas no provocan una respuesta inmune por si mismas, pero generan anticuerpos cuando se unen a moléculas más grandes; tales moléculas pequeñas se denominan *haptenos*. Dado que dichas moléculas pequeñas participan en ensayos de unión competitiva donde la proteína de unión es un anticuerpo, el ligando se puede referir como un hapteno.

El ligando en la ecuación 13-1 es el compuesto que se va a cuantificar. A menudo los ligandos son medicamentos (digoxina, teofilina), hormonas (cortisol, T_4), o vitaminas (B_{12}). Para la mayoría de las reacciones de unión competitiva, el ligando se refiere al compuesto analizado o a un derivado marcado del compuesto analizado. Ambos deben unirse a la proteína de unión específica para el compuesto analizado que se va a medir. El complejo final de la proteína de unión y el ligando es generalmente estable y se disocia solamente en circunstancias favorables.

La reacción de unión descrita en la ecuación 13-1 es más compleja para los ligandos más grandes, como las proteínas, porque las macromoléculas tienen muchos sitios de unión diferentes (determinantes antigénicos) en su superficie. Una proteína por consiguiente puede tener más de un anticuerpo simultáneamente unida a ella. Tales determinantes de unión pueden ser estructuralmente muy diferentes el uno del otro, de tal manera que la población de anticuerpos generada a moléculas grandes en una respuesta inmune es heterogénea (antisuero policlonal). Los determinantes antigénicos, tanto de los inmunógenos de alto peso molecular como de los haptenos de bajos peso molecular, son similares cuando uno considera el comportamiento de las reacciones antígeno-anticuerpo. Aunque las macromoléculas pueden ser medidas por ensayos competitivos de unión a proteína, los métodos no competitivos se emplean más a menudo. Estos se tratan en el Capítulo 12.

La ley de la acción de masas describe algunos aspectos del fenómeno que ocurre cuando las moléculas se unen entre sí. Esto se ilustra mejor cuando uno examina la concentración de un anticuerpo (Ac) y su ligando (L) o contraparte específica de unión, en condiciones de

equilibrio. La reacción bimolecular



puede reordenarse para el cálculo de la constante de asociación en equilibrio

$$K_a = \frac{k_1}{k_2} = \frac{[\text{Ac:L}]}{[\text{Ac}] [\text{L}]} \quad \text{Ec. 13-3}$$

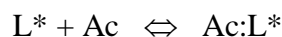
donde k_1 y k_{-1} son las constantes de velocidad respectivas para la asociación y disociación del complejo unido; $[\text{Ac}]$ es la concentración del anticuerpo no unido o libre en el equilibrio; $[\text{L}]$ es la concentración en equilibrio del ligando no unido (un término que denota al antígeno, *hapteno*, u otra sustancia); y $[\text{Ac:L}]$ es la concentración en el equilibrio del complejo ligando-anticuerpo. K_a , también denominada como *constante de afinidad*, se expresa en concentraciones molares recíprocas (M^{-1}) o litros por mol (L/mol). Este es el volumen en el cual una mol de la proteína de unión se puede diluir para producir 50% de unión del ligando. A mayor K_a , mayor será la afinidad del anticuerpo por el ligando. Por consiguiente, para una cantidad constante de anticuerpo en la reacción, se requiere menos cantidad de ligando para que el anticuerpo de alta afinidad se una al 50% del ligando que la que se necesita para unir 50% de un anticuerpo de baja afinidad. El antisuero producido por un animal que ha sido inmunizado con un inmunógeno de alto peso molecular generalmente contiene una mezcla de diferentes poblaciones de anticuerpos (antiseros policlonales) contra ese antígeno. Estas diferentes poblaciones del anticuerpo varían en su capacidad para unir el ligando (afinidad) y en su capacidad para reconocer diferentes sitios en la superficie de la proteína.

Hay solo una población uniforme de sitios de unión para un ligando cuando la proteína de unión o el anticuerpo es homogénea, como en el caso de los anticuerpos monoclonales, que tienen una afinidad de unión uniforme (K_a) y especificidad por el antígeno.

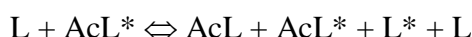
Las proteínas y anticuerpos de baja afinidad tienen característicamente constantes de afinidad de asociación en el orden de 10^5 a 10^7 L/mol , mientras que los compuestos enlazantes apropiados para los inmunoensayos y otros ensayos de unión competitiva tienen constantes de asociación entre 10^8 y 10^{11} L/mol . Una constante de asociación alta le permite a uno diseñar ensayos con sensibilidades hasta de 10^{-12} M , o inferiores, siempre y cuando la marca misma sea cuantificable a estas concentraciones tan bajas.

Comportamiento de los Ensayos de Unión Competitiva

Los ensayos de unión competitiva pueden concebirse como la adición de cantidades crecientes de ligando no marcado a la mezcla de reacción, que contiene cantidades conocidas y constantes de ligando marcado, y una proteína de unión específica. En este caso, el ligando denominado, L^* , y el anticuerpo, Ac , se adicionan juntos en cantidades equimolares. Si uno asume que todo el L^* está unido, la reacción viene a ser



Dos cosas suceden con la adición de las cantidades crecientes de ligando no marcado (L): (1) el ligando no marcado compite con el ligando marcado por los sitios de unión del anticuerpo, y (2) hay un exceso del ligando total (L y L*) en la solución comparado con el número de sitios de unión. Por consiguiente, la concentración de los sitios que unen anticuerpos es limitante con respecto al ligando total, por lo tanto modificando la reacción anterior se obtiene:



Una cantidad menor de L* está unida al anticuerpo (como Ac:L*); por lo tanto mayor cantidad de L* está libre a medida que aumenta la cantidad de L. La cantidad o el porcentaje de L* en la forma unida pueden calcularse de las cantidades de L y L* presentes.

Cuando el porcentaje de ligando marcado unido se grafica como una función de la concentración del ligando no marcado, se produce la curva dosis-respuesta mostrada en la Fig. 13-1. El término *curva dosis-respuesta* se aplica a una gráfica de unión contra cantidades crecientes del ligando. La curvatura de la gráfica dosis-respuesta en la Fig. 13-1 se atribuye al aumento logarítmico del porcentaje de L que está unido, cuando la concentración de L (dosis) en el ensayo aumenta aritméticamente. Por lo tanto la disminución en L* unido también es logarítmica. La conversión de la concentración de L a un logaritmo hace que la relación se vuelva más linear.

Formatos de Ensayo de Unión Competitiva

La Fig. 13-1 muestra que para derivar una curva dosis-respuesta, se debe conocer la cantidad de ligando marcado que está unido al anticuerpo como una función de la cantidad de ligando no marcado que se adiciona. Se han desarrollado una variedad de técnicas para medir ya sea las formas unidas o las libres del ligando marcado en un formato de unión competitiva.

Algunas de estas técnicas requieren que el ligando marcado unido al anticuerpo se separe físicamente del ligando marcado libre. Estos ensayos se denominan *ensayos heterogéneos*. Los tipos de inmunoensayos que no requieren separación física del ligando marcado unido y libre se llaman *ensayos homogéneos*. La actividad de la marca en un ensayo homogéneo se altera cuando el ligando marcado se une a la proteína de unión específica; por lo tanto los ligandos marcados unidos pueden distinguirse directamente de los libres.

Ensayos heterogéneos

En la Tabla 13-2 se enumeran algunos de los métodos comúnmente usados para separar los ligandos marcados unidos a proteína de los ligandos marcados libres. Por ejemplo, el ligando o anticuerpo se une covalentemente o se adsorbe a las superficies plásticas hidrofóbicas de los pozos de reacción en las placas de microvaloración, proporcionando un soporte aplicado universalmente para las *fases de captura* en diferentes ensayos heterogéneos. La fase de captura se une al reactivo marcado en un ensayo heterogéneo de unión competitiva, ya sea dicho reactivo el ligando marcado o el anticuerpo marcado. En otro sistema, la fase de captura



constituida de micropartículas, se usa ampliamente por dos razones: (1) las fases de micropartículas en suspensión tienen aproximadamente una cinética similar a la de una solución en que las distancias de difusión son muy cortas comparadas con la superficie de un pozo de la placa de microvaloración o un tubo recubierto de poliestireno y (2) las micropartículas en comparación, proporcionan también una área superficial muy grande. Por ejemplo, 1 mg de partículas de 1 μm de diámetro tiene 60 cm^2 de área superficial para la inmovilización del anticuerpo o ligando comparado con los 1.0 ó 1.5 cm^2 de área superficial de un pozo de microvaloración. Estos atributos acortan el tiempo de ensayo y aumentan potencialmente su sensibilidad.

El látex y las micropartículas paramagnéticas se usan en formatos similares de ensayos heterogéneos; ambos pueden usarse para separar fácilmente la marca unida de la no unida, una mediante la filtración a través de un filtro poroso y la otra mediante atracción magnética.

Otros métodos para separar ligandos marcados de los no marcados se enumeran en la Tabla 13-2. Tanto la técnica adsorbente no específica como la técnica de doble anticuerpo se han usado con marcas isotópicas.

En algunos casos, los métodos competitivos incorporan una estrategia de captura indirecta donde un par no relacionado ligando-proteína de unión se usa para agrupar la fase sólida con el anticuerpo de captura o el ligando. En un ejemplo clásico, la estreptavidina inmovilizada se une a la biotina que se ha unido covalentemente a un anticuerpo o al ligando. Las ventajas de este enfoque se tratan a continuación. Se ha logrado la automatización de algunos de los métodos descritos en el Tabla 13-2, dando lugar una mejor precisión (ver Capítulo 16, págs. 304 a 309).

Inmunoensayos homogéneos

Por definición, la actividad de la marca en una ensayo homogéneo se modula cuando se une a la proteína de unión específica; una excepción a esta definición generalizada para los inmunoensayos homogéneos está basada en la dispersión de luz por micropartículas. En vez de que el anticuerpo module la señal por si mismo, los cambios en la dispersión de luz se producen mediante la formación de los complejos anticuerpo: ligando:partícula, donde ya sea el anticuerpo o el ligando (o ambos) se unen de manera multivalente a las partículas de látex; la contraparte de unión correspondiente también es multivalente, por lo tanto permite que los componentes formen complejos aglutinados más grandes. Posteriormente en este capítulo se describe un ejemplo.

Ligandos Marcados

Tipos de marcas

Entre los tipos de indicadores comunes usados para marcar los ligandos se incluyen los radioisótopos, enzimas y fluoróforos. Estos pueden usarse tanto en los ensayos de unión competitiva homogéneos como en los heterogéneos. El tipo de marca, ensayo, y sistema de detección se presentan en la Tabla 13-3.

Factores que determinan la elección de la marca

Radioisótopos.

Las marcas radioisotópicas se usan solo en inmunoensayos heterogéneos porque la



unión con el anticuerpo no afecta la desintegración radiactiva. En general, la sensibilidad deseada del ensayo limita la elección de las marcas radiactivas para ciertos isótopos que tienen alta actividad específica, producción de alta energía, vidas medias manejables, y rápida disponibilidad. El radioisótopo debe incorporarse fácilmente a la molécula del ligando o acoplarse a éste (o al anticuerpo) y su emisión debe detectarse fácilmente. Los isótopos que cumplen estos requisitos se enumeran en la Tabla 13-4. La consideración de todos los factores, especialmente la alta actividad específica, la facilidad de la incorporación y una vida media razonablemente corta, ha hecho del ^{125}I la marca preferida para la mayoría de los radioensayos.

Enzimas.

El uso de las enzimas como marcas difiere del manejo de los radioisótopos en que la reacción de unión puede modificar la actividad enzimática. Además, las enzimas deben tener una alta actividad específica (o sea, la conversión de varias moles de sustrato a producto por minuto por mol de enzima) y también deben unirse fácilmente al ligando o al anticuerpo sin pérdida importante de la actividad. Las enzimas que se usan comúnmente incluyen fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, glucosa oxidasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, y peroxidasa.

Algunos inmunoensayos enzimáticos homogéneos se basan en el uso de un componente inactivo de una molécula enzimática como la marca. En el sistema de inmunoensayo por reactivación de apoenzima (más conocido por siglas en inglés, ARIS, para el término "Apoenzyme-Reactivation Immunoassay System"), el grupo prostético de glucosa oxidasa es un reactivo marca que se recombina con apoglucosa oxidasa inactiva para generar una enzima plenamente activa. De igual manera, un fragmento polipeptídico de β -galactosidasa es el reactivo marca para los ensayos competitivos de unión a proteína basados en el inmunoensayo del donador enzimático clonado (IDEC). Ambas tecnologías se tratan más detalladamente adelante.

Sustratos.

Los sustratos de las marcas enzimáticas también ayudan a definir los medios para la detección y en algunos casos el formato de cómo se realizará el ensayo. Los ejemplos se muestran en la Tabla 13-3. Hasta hace poco, los sustratos más comúnmente usados eran cromogénicos o fluorogénicos, donde el producto catalizado por la enzima es de color o fluorescente, respectivamente. Los sustratos luminogénicos de la enzima que emiten luz durante la catálisis enzimática también han sido adoptados para las aplicaciones de rutina, en particular en los inmunoensayos de ligandos que requieren mayor sensibilidad para la detección y cuantificación.

Aunque generalmente uno puede medir una concentración mil veces inferior de un fluoróforo por técnicas de fluorescencia que por los métodos colorimétricos, la ganancia en la sensibilidad del ensayo con sustratos fluorogénicos para las marcas enzimáticas es, en el mejor de los casos, solamente de unas decenas a algunos cientos de veces. Generalmente se alcanzan sensibilidades mayores que las que se ven por técnicas fluorescentes o colorimétricas cuando de emplean sustratos luminogénicos. Ya que las marcas enzimáticas amplifican las moléculas del ligando o el anticuerpo que participan en la reacción de unión, se puede lograr una mayor sensibilidad usando tiempos de incubación más largos para la conversión del sustrato al



producto. Esta es una característica indeseable de algunos sustratos cromogénicos, en particular cuando existen ensayos más rápidos disponibles que emplean sustratos fluorogénicos o luminogénicos. Hay dos tipos de sustratos luminogénicos. Cuando ocurre una reacción de “destellos”, la luz emitida se mide dentro de un lapso de 5 a 10 segundos después de que la reacción se inicia, mientras que el "brillo" producido por los sustratos de dioxetano al hidrolizarse puede medirse desde 2 minutos hasta 2 horas a partir del inicio de la reacción.

Fluoróforos.

Los fluoróforos elegidos como marcas despiden luz fluorescente con un alto grado de eficiencia aún cuando están unidos al ligando o al anticuerpo. Las longitudes de onda de absorción (excitación) y las de emisión se separan apropiadamente (desplazamiento de Stokes), de manera que la dispersión de luz no contribuye a la fluorescencia observada a la longitud de onda de emisión. Algunos ejemplos de fluoróforos usados como marcas para los ensayos de unión competitiva, así como sus propiedades se muestran en la Tabla 13-5. Entre estos, los quelatos de fluoresceína y europio se usan comúnmente. Los quelatos de metales lantánidos de tierras raras; europio y terbio absorben la luz fuertemente y fluorescen con propiedades que dependen del ligando quelante. El rendimiento cuántico (el coeficiente: entrada del fotón / salida del fotón) es muy alto y las longitudes de onda de emisión y excitación se separan bien. El europio y la fluoresceína tienen coeficientes de extinción y rendimientos cuánticos altos, pero el europio tiene la separación mayor entre las longitudes de onda de emisión y excitación y (273 nm).

Micropartículas.

Cuando una micropartícula adherida multivalentemente con el anticuerpo o ligando forma complejos de agregados al unirse a su contraparte de unión específica, el tamaño aumentado de la partícula cambia la cantidad y la dirección de la luz dispersada. Para reducir al mínimo la señal del ruido de fondo, la partícula medida debe tener un diámetro menor que la longitud de onda de detección; por lo tanto las partículas no agregadas óptimas tienen un diámetro menor a 1 μm . Tanto la turbidimetría como la nefelometría se usan comúnmente para medir las reacciones de unión en las reacciones competitivas de dispersión de luz basadas en micropartículas. La turbidimetría mide la disminución de la luz incidente como una función de la dispersión de luz, debido a que el tamaño de las partículas agregadas se incrementa. Por lo tanto, estos cambios se detectan como aumentos de absorbancia a una longitud de onda particular. La nefelometría mide directamente la luz dispersada a un ángulo mayor que 90 grados con respecto a la luz incidente (dispersión frontal de luz). La turbidimetría tiene mayor aplicabilidad en diferentes sistemas analíticos o clínicos, ya que puede realizarse con un espectrofotómetro. La nefelometría, al igual que la fluorescencia y la luminiscencia, requiere instrumentación óptica especial.

Otras marcas

Otros marcadores que proporcionan las bases de diferentes tecnologías homogéneas competitivas de unión a proteína son las marcas de grupo prostético y las marcas de sustrato respectivamente. El SIRA emplea el grupo prostético FAD de la glucosa oxidasa como su reactivo marca.

El reactivo marca para el inmunoensayo fluorescente de unión competitiva por sustrato



marcado, β -galactosil-umbeliferona fluorogénica, es hidrolizado por la β -galactosidasa a umbeliferona fluorescente cuando el ligando marcado no está unido por el anticuerpo.

Límites de Detección (Sensibilidad)

La sensibilidad de un ensayo de una reacción de unión depende de la afinidad de la proteína de unión por su ligando. En consecuencia, para que ocurra el 50% de unión, un ligando presente a una concentración de 1×10^{-7} M requeriría un anticuerpo que tenga una K_a de 10^7 L/mol, mientras que un ligando presente a una concentración de 1×10^{-10} necesitaría un anticuerpo que tuviera una K_a de 1×10^{10} L/mol.

En condiciones ideales la proteína de unión en un ensayo de unión competitiva tendría la misma afinidad por los ligandos, tanto el marcado como el no marcado. Generalmente esto no es el caso. En algunos casos, la marca o el procedimiento de marcaje alterará las propiedades inmunoquímicas del ligando al grado que el anticuerpo no se unirá a dicho ligando en la manera en que lo hace el compuesto no marcado, y en otros casos lo inverso es también cierto; los anticuerpos hechos contra haptenos pueden incluir afinidad por el puente químico usado para acoplar el ligando al acarreador de la proteína. Tales anticuerpos pueden tener una afinidad mayor por el ligando marcado con el puente químico que la que tienen por el ligando no modificado.

La sensibilidad de un ensayo de unión competitiva a menudo se mejora si el ligando tiene tiempo suficiente para unirse al anticuerpo antes de la adición del conjugado del ligando marcado. Este ensayo de unión competitiva *secuencial* es particularmente útil cuando el anticuerpo tiene mayor afinidad por el conjugado del hapteno que por el hapteno solo comparado con un formato competitivo *simultáneo*, donde el ligando de la muestra y el conjugado del ligando tienen acceso igual al anticuerpo. La respuesta a la presencia del ligando de la muestra es generalmente mayor en un formato secuencial, ya que el ligando tiene más oportunidad de ocupar los sitios disponibles de unión al anticuerpo que la que tendría en un formato simultáneo.

Además de la relación con la afinidad de la reacción de unión, los límites de detección o sensibilidad de los ensayos de unión competitiva son también dependientes de la capacidad de detección relativa de las especies marcadas. Por ejemplo, un fluoróforo debe proporcionar mayor sensibilidad que un cromóforo; el producto fluorescente o luminescente de la catálisis de la marca enzimática ubicará el límite de detección 1 a 2 órdenes de magnitud debajo de aquel que se observa generalmente con los cromógenos como sustratos; los quelatos de europio pueden proporcionar mayor sensibilidad que el ^{125}I debido a su mayor densidad de marca comparada con el ^{125}I , el cual está limitado (para evitar daño al reactivo marcado debido a la radiactividad).

El límite de detección puede definirse como la concentración más baja de un ligando que puede distinguirse con exactitud y precisión del valor cero (ligando). Por consiguiente, por definición cualquier interacción no específica que contribuye a la señal en ausencia del ligando compromete el límite de detección al disminuir el cociente de señal sobre ruido (S/R), por lo tanto es más difícil distinguir la señal derivada de la reacción de unión específica de la que es atribuible a la unión no específica (UNE) y a otras interferencias no específicas. Aunque otros tipos de interferencia son predominantes en los ensayos tanto homogéneos como heterogéneos, la UNE es un problema común en estos últimos, donde el conjugado marcado

por ligando o el conjugado marcado por anticuerpo se une inespecíficamente a la fase sólida. Este fenómeno puede ser atribuible a los sitios de la fase sólida disponibles para la adsorción hidrofóbica o adsorción iónica, porque los sitios de unión en la superficie de la fase sólida no están saturados o hay cambios en la superficie después del recubrimiento o la modificación química. La reducción de la UNE se logra a menudo mediante la inclusión de proteínas bloqueadoras o detergentes en las reacciones.

Reactividad Cruzada (Especificidad)

La especificidad de una proteína de unión por su ligando se mide por su capacidad de unirse únicamente al ligando y no a otras sustancias. Las moléculas de reacción cruzada son estructuralmente tan similares al ligando que también se unen al anticuerpo. Mientras mayor es la diferencia química entre el ligando y un potencial compuesto de reacción cruzada, menor es la probabilidad de que el reactivo cruzado se una. Algunos ejemplos de reactivos cruzados potenciales son los análogos de medicamentos y sus metabolitos, que se prueban en ensayos de medicamentos, así como las hormonas de bajo peso molecular que son similares en estructura, como T_3 y T_4 para sus ensayos respectivos. Las diferencias de unión al anticuerpo del ligando y de las sustancias de reacción cruzada dependen de las diferencias en afinidad. Estas diferencias se reflejan a través de las respuestas a reactivos cruzados en los ensayos de unión competitiva. La Tabla 13-6 muestra dos ejemplos de la relación entre la K_a del anticuerpo por su ligando, dos reactivos cruzados, y la concentración de cada uno que se requiere en el ensayo para producir la misma respuesta de unión. La concentración del reactivo cruzado requerida para una unión del 50% al anticuerpo₁ es 10 veces la concentración necesaria para unir el 50% del ligando₁. De igual manera, se requieren 10,000 veces menor cantidad de ligando₂ para obtener 50% de unión al anticuerpo₂ que la cantidad necesaria para unir el 50% del reactivo cruzado_d. La Tabla 13-6 muestra que con una K_a inferior se requiere más anticuerpo para unir 50% del ligando o del reactivo cruzado e ilustra además la relación entre la sensibilidad y K_a . El grado en el cual cada reactivo cruzado de la Tabla 13-6 interfiere con el análisis de cada ligando depende de las concentraciones relativas del ligando y del reactivo cruzado en las muestras reales. Por ejemplo, los reactivos cruzados c y d probablemente **no** interferirían en el ensayo del ligando₂, *a menos que* estuvieran presentes en concentraciones 100 ó 10,000 veces mayores, respectivamente, que las del ligando₂.

En condiciones ideales, los anticuerpos u otras proteínas de unión que participan en las reacciones de unión competitiva son muy específicos para el ligando y esencialmente no tienen reactividad cruzada con moléculas estrechamente relacionadas. En condiciones reales, los anticuerpos presentes en un antisuero heterogéneo se unen el ligando con diferentes afinidades y orientaciones y por consiguiente también tienen probabilidad de unirse a moléculas estructuralmente similares. Una de las ventajas de los anticuerpos monoclonales es el potencial para seleccionar anticuerpos muy específicos con, esencialmente, ninguna reactividad cruzada con otros compuestos. Los ejemplos de reactividad cruzada de antisueros con un anticuerpo monoclonal se muestran en las Figs. 13-2 y 13-3. Las curvas dosis-respuesta con antisuero, mostradas en la Fig. 13-2, indican que la cafeína, que es estructuralmente similar al medicamento antiasmático teofilina, compete eficazmente con la marca por los sitios de unión a teofilina únicamente en concentraciones mucho mayores. El grado de reactividad cruzada de cafeína, determinado por el enfoque "clásico", se calcula al dividir la concentración del ligando



(en este caso teofilina) al 50% de la unión máxima (indicado en la Fig. 13-2) entre la concentración del reactivo cruzado (cafeína), que también desplaza un 50% de la marca según la siguiente ecuación:

$$\frac{[\text{ligando}] \text{ al } 50\% \text{ de unión}}{[\text{reactivo cruzado}] \text{ al } 50\% \text{ de unión}} (100) = \% \text{ de reactividad cruzada} \quad \text{Ec. 13-4}$$

Como se muestra en la Fig. 13-3, hay 12.3% de reactividad cruzada de la cafeína para el antisuero mostrado en la Fig. 13-2, pero solamente 1.2% de reactividad cruzada con el anticuerpo monoclonal contra teofilina. La Tabla 13-7 resume estos resultados. Un ensayo de unión competitiva que usa el anticuerpo monoclonal contra teofilina es más específico que uno que usa el antisuero; en consecuencia, basado en este análisis, el primer ensayo sería menos propenso a la interferencia causada por la cafeína.

Aunque el enfoque clásico para determinar la reactividad cruzada es útil para evaluar la respuesta en el ensayo comparativo del ligando y del reactivo cruzado, el enfoque "*funcional*" es más importante. Este último determina la contribución de un reactivo cruzado potencial a la respuesta del ensayo de unión competitiva en presencia del ligando. Por ejemplo, tanto el ligando como el reactivo cruzado están compitiendo entre ellos mismos y con el conjugado de ligando marcado por los sitios de unión al anticuerpo. En consecuencia, no resulta sorprendente que un reactivo cruzado con reactividad cruzada de 1% a 2% en el método clásico, aumente la concentración conocida de un ligando en un 10% a un 20%. Un enfoque para evaluar la reactividad cruzada funcional es determinar la respuesta del ensayo a concentraciones crecientes del reactivo cruzado a diferentes concentraciones del ligando. La Tabla 13-8 resume la reactividad cruzada de la cafeína, teobromina, y diversos metabolitos de teofilina a una concentración de nivel intermedio de teofilina comparada con la que se observa usando el enfoque clásico, mientras que la Fig. 13-4 ilustra la respuesta de diversos reactivos cruzados en un ensayo funcional.

Ahora que los anticuerpos monoclonales producidos de líneas celulares inmortales pueden someterse a tamizaje fácilmente para afinidad muy alta ($K_a = 10^{11} - 10^{12} \text{M}^{-1}$) con especificidad casi absoluta, estas proteínas de unión se prefieren a los anticuerpos policlonales, que son a menudo inconsistentes en calidad y disponibilidad.

Reducción de Datos

Anteriormente, en este capítulo fue descrita la reacción de desplazamiento por la ecuación



donde Ac es el anticuerpo u otra proteína de unión que proporciona un número limitado de sitios de unión al ligando. La concentración del ligando marcado, L^* , es constante y está en exceso con respecto a la concentración de los sitios de unión. El ligando, L, competirá con L^* por los sitios de unión disponibles. Según se muestra en la Fig. 13-1, la cantidad de L^* unida al anticuerpo es inversamente proporcional a la concentración de L en el ensayo. La respuesta



a la dosis es una medida del L^* unido o del L^* libre que ha sido desplazado por L . El radioinmunoensayo (RIA) servirá para ilustrar los métodos comunes para generar las curvas dosis-respuesta y cuantificar las concentraciones de los compuestos analizados.

Los datos mostrados en la Tabla 13-9 se generaron con un RIA de doble anticuerpo para el antibiótico aminoglucósido amikacina, donde la ^{125}I -amikacina fue el ligando marcado. El anticuerpo primario fue el antisuero de conejo contra amikacina. El antisuero caprino contra los anticuerpos de conejo se incluyó en el ensayo para precipitar el ligando marcado unido al anticuerpo. El precipitado se colecta mediante centrifugación, y se cuenta la radiactividad del comprimido resultante en el fondo del tubo después que el sobrenadante se ha removido. La cantidad de *cuentas por minuto de unión no específica (UNE)* se refiere a la radiactividad unida inespecíficamente al fondo del tubo en ausencia del anticuerpo contra amikacina.

La Tabla 13-9 indica cómo se procesan los datos de RIA de amikacina para generar dos curvas dosis-respuesta comunes. Además de las cuentas de unión totales por minuto (TU), el eje y puede expresarse como un % de U , o logit U/U_0 . La transformación logit es la siguiente:

$$\text{Logit}(U/U_0) = \ln U/U_0 / 1 - U/U_0 \quad \text{Ec. 13-5}$$

Las cuentas de unión por minuto y el % de U pueden graficarse como una función de la dosis aritmética de la concentración del ligando aún y cuando las curvas resultantes no son lineales (ver Fig. 13-1), o pueden graficarse contra el logaritmo de la concentración para producir la curva dosis-respuesta ligeramente sigmoidea vista en la Fig. 13-5. La gráfica del logaritmo de la dosis contra logit U/U_0 (también mostrado en la Fig. 13-5) ha sido el método empírico más aceptado para linealizar las curvas dosis-respuesta de unión competitiva a proteína, en particular para los RIAs. La reducción automática de datos y el procesamiento de la transformación log-logit se realizan fácilmente con instrumentos computarizados, que ofrecen diversas transformaciones de los ejes con ecuaciones polinomiales y ajustes de la curva de cuatro parámetros que son adecuados para las líneas de calibración curvilínea.

Ejemplos de Ensayos de Unión Competitiva

Radioinmunoensayo (RIA)

En la técnica de radioinmunoensayo, el ligando y una cantidad constante de ligando marcado radiactivamente compite por un número limitado de sitios de unión al anticuerpo. La concentración del anticuerpo es generalmente suficiente para unir entre 30% y 80% del material marcado. En el ejemplo anterior, el anticuerpo contra la amikacina unió 64% de la ^{125}I -amikacina en ausencia del ligando no marcado. La adición del ligando no marcado a la reacción produce un aumento neto del ligando total (marcado más no marcado), pero debido a la competencia por los sitios de unión al anticuerpo, habrá una disminución en la proporción del ligando marcado que se unirá al anticuerpo. Si uno cuenta la radiactividad unida al anticuerpo después del paso de separación, la curva dosis-respuesta tendrá una pendiente negativa similar a la que se muestra en la Fig. 13-1. A medida que aumenta la concentración del ligando no marcado y los sitios de unión al anticuerpo se acercan a la saturación, la

pendiente pierde inclinación. Cuando el ligando marcado radiactivamente no unido se monitorea, la curva dosis-respuesta tiene una pendiente positiva pero con la misma forma.

La técnica de radioinmunoensayo es aplicable a la medición de ligandos de bajo y alto peso molecular, bajo la premisa de que el procedimiento de marcaje o el conjugado del ligando marcado no afecte *per se* de manera adversa la inmunorreactividad del ligando. Estos problemas se superan al marcar el anticuerpo en lugar del ligando, porque las diferencias estructurales principales entre las moléculas de IgG son sustancialmente menores que las diferencias entre los ligandos. La probabilidad de que ocurran pérdidas en la inmunorreactividad es menor cuando se marca el anticuerpo.

Los ensayos basados en el uso de un anticuerpo marcados se denominan ensayos *inmunométricos*. Aquel que usa un anticuerpo radioisotópicamente marcado es un ensayo inmunoradiométrico (IRM), que se conoce en inglés como IRMA (Immuniradiometric Assay). El ligando en la muestra compite con el ligando adherido a una superficie sólida por los sitios de unión del anticuerpo marcado (Fig. 13-6). La cantidad de anticuerpo marcado unido a la superficie sólida se determina después que se remueven el exceso de la marca y de la muestra. También se muestra en la Fig. 13-6 una curva dosis-respuesta representativa. El formato inmunométrico es considerado nuevamente en la discusión de las técnicas de ELISA.

Ensayo inmunoenzimático

Los ensayos inmunoabsorbentes unidos por enzima (más conocido como ELISA por sus siglas en inglés, que significan Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) son ensayos no isotópicos heterogéneos que tienen generalmente un anticuerpo inmovilizado sobre un soporte sólido (ver Tabla 13-2) mientras que el ligando se marca con una enzima. La Tabla 13-10 enumera algunas enzimas usadas para el ELISA (u otros inmunoensayos enzimáticos). Estas enzimas son útiles como marcas porque satisfacen los siguientes criterios:

1. *Alta actividad específica.* La amplificación de señales obtenida con una marca enzimática corresponde a la cantidad de sustrato convertido al producto durante el tiempo de incubación. Las enzimas con las actividades específicas más altas producen la amplificación mayor. Los ensayos que usan dichas enzimas tienen una sensibilidad excelente y pueden medir concentraciones muy bajas del ligando.
2. *Fácil acoplamiento al ligando.* Las enzimas tienen suficientes aminoácidos ácidos y básicos, grupos tiol, o carbohidratos para acoplarse fácilmente al ligando sin perder sustancialmente la actividad enzimática.
3. *Estabilidad.* Las marcas enzimáticas son estables durante el ensayo y en condiciones refrigeradas de almacenamiento.
4. *Ausente en fluidos o tejidos.* Las enzimas no están generalmente presentes en el fluido biológico o en la muestra tisular por analizarse.
5. *Retención de la actividad.* Las enzimas retienen la mayor parte de su actividad cuando se unen al ligando o al anticuerpo.

La fosfatasa alcalina y la peroxidasa de rábano están disponibles económicamente en una forma sumamente purificada. Por esto y las razones enumeradas anteriormente, estas dos enzimas se usan con mayor frecuencia como marcas para el ELISA.

Algunas de las enzimas enumeradas en la Tabla 13-10 pueden usar cromógenos, fluorógenos o luminógenos como sustratos.

Una ventaja de un sustrato cromogénico es que su producto puede detectarse

visualmente. Los productos fluorescentes y luminescentes pueden ser detectados a concentraciones de 100 a 1000 veces inferiores que las de los cromóforos y el tiempo de incubación también puede reducirse.

Se han implementado muchas configuraciones para el ELISA. Algunas se basan en las reacciones competitivas, mientras que otras son ensayos de "sandwich" inmunométricos directos. El ELISA de sandwich se discute en el Capítulo 12. Los dos formatos básicos para los ensayos competitivos y la forma de las respectivas curvas dosis-respuesta características que describen la señal remanente en la fase sólida se muestran en las Figs. 13-7 y 13-8.

De los dos, se ha descrito con mayor frecuencia la configuración en la cual el anticuerpo se ha inmovilizado sobre la superficie sólida (Fig. 13-7). Esto es similar a la configuración en un RIA, porque el ligando en la muestra compite con el ligando marcado enzimáticamente por la cantidad limitada de sitios de unión al anticuerpo fijados a la fase sólida. Después que la reacción de unión se ha llevado a cabo, la fase sólida se lava con amortiguador a fin de remover el ligando marcado no unido para que no contribuya a la señal. La cantidad de enzima ligada a la fase sólida es proporcional a la absorbancia, fluorescencia o luminescencia del producto formado después de la adición del sustrato y es inversamente proporcional a la concentración del ligando no marcado. Este método es aplicable a los compuestos analizados de bajo y de alto peso molecular.

En vez del anticuerpo, el ligando puede adherirse a la fase sólida como se muestra en la Fig. 13-8. Solo aquellos sitios de unión a la asociación anticuerpo-enzima que no están ocupados por el ligando de la muestra se unirán al ligando inmovilizado. El complejo [fase sólida:ligando]-[enzima:anticuerpo] se lava con amortiguador antes de agregar el sustrato. Los ELISAs inmunométricos tienen algunas de las ventajas que los ensayos IRMs cuando se comparan con un ELISA con un ligando marcado enzimáticamente.

Aunque ambos formatos del ELISA ilustrados en las Figs. 13-7 y 13-8 miden la cantidad del conjugado marcado unido a la fase sólida, también puede medirse la actividad que permanece en la solución después que la reacción de unión se ha llevado a cabo.

En la descripción anterior de ensayos heterogéneos, también se describieron algunas de las fases de captura útiles para separar el anticuerpo unido del ligando marcado no unido, a saber, las placas de microvaloración, látex, y diversos tipos de micropartículas. Las micropartículas paramagnéticas son aplicables a aquellos sistemas que emplean imanes, mientras que las micropartículas de látex son atrapadas por filtros de fibra de vidrio o membranas antes o después de que la reacción de unión se lleve a cabo, pero siempre antes de que los pasos de lavado y adición de los sustratos de la enzima. De igual manera, el anticuerpo se adsorbe a los filtros de fibra de vidrio con la ayuda de un enrejillado formado con anticuerpos secundarios, o se adsorbe a las membranas. Tanto la fibra de vidrio como los soportes de la fase de captura del filtro de la membrana son componentes de los cassettes de flujo de los instrumentos automáticos así como el soporte de captura y el área de lectura para los dispositivos rápidos de ensayo usados con frecuencia para las pruebas del embarazo, ovulación y enfermedades infecciosas.

Una de las desventajas para la adsorción de anticuerpos a las superficies sólidas como el poliestireno de las placas de microvaloración o las membranas de los dispositivos de ensayo rápido, es que ambos anticuerpos, monoclonales y policlonales, pueden experimentar una pérdida sustancial en la capacidad de unirse al antígeno debido a los cambios conformacionales al adsorberse en tales superficies. Se han descrito ejemplos donde menos de 5% de los



monoclonales adsorbidos permanecieron funcionales. Las pérdidas principales (~50%) también se ven donde los anticuerpos se han adherido covalentemente al soporte sólido. Para estandarizar los ensayos y superar la pérdida en la capacidad de unir antígeno, se desarrollaron fases de captura indirecta. El sistema de avidina-biotina es un ejemplo. La avidina (o estreptavidina) se une a la biotina con afinidad muy alta ($K_a = 10^{15} \text{M}^{-1}$) y parece retener sus cuatro sitios de unión al unirse a la fase sólida. La terminación de la fase de captura ocurre cuando la avidina inmovilizada se une a un anticuerpo biotinilado o al ligando para que los eventos de unión inmunológica se lleven a cabo a una capacidad máxima de unión del anticuerpo-ligando. La Fig. 13-9 ilustra la capacidad de captura aumentada de un anticuerpo antipeptido biotinilado ligado a la estreptavidina inmovilizada a partículas de látex biotinilado. La figura demuestra que la capacidad aumentada es una función de la densidad de biotina del anticuerpo.

Aparte de los pares de unión biotina-avidina, se han usado antiluoresceína-fluoresceína, y antidigoxigenina-digoxigenina para formar las fases de captura indirecta.

Además de superar la capacidad disminuida de captura de anticuerpos, su uso también tiene una ventaja más práctica: la fase de captura puede ser un componente de un reactivo universal para una familia de diferentes ensayos heterogéneos de unión competitiva. Por ejemplo, las mismas partículas magnéticas acopladas a antiluoresceína se usan para captar los anticuerpos antiligandos fluoresceinados en los ensayos de unión competitiva para diferentes hormonas esteroideas.

También se han creado esquemas de amplificación o cascadas para los ELISAs, y teóricamente deben mejorar su sensibilidad.

Fluorescencia resuelta por tiempo (ver también Capítulo 4, p. 99)

Los quelatos de metales lantánidos tienen ventajas importantes al usarse como marcas comparados con otros fluoróforos empleados en los ensayos de unión competitiva. Por ejemplo, los tiempos de vida de fluorescencia de los quelatos del europio son sumamente largos, 100 μseg o mayores que otros fluoróforos (5 nseg para la fluoresceína). Con la instrumentación apropiado, uno puede medir esta fluorescencia alrededor de 1 μseg o más después de un pulso de la luz de excitación y distinguir la fluorescencia de las interferencias fluorescentes de fondo que poseen vida corta. Esto es la base para los fluoroinmunoensayos resueltos por tiempo, ensayos heterogéneos que tienen intrínsecamente bajo ruido de fondo y son capaces de alcanzar sensibilidades hasta mil veces mayores que las de otros métodos de fluorescencia basados en el ELISA.

La fluorescencia del quelato europio ocurre a longitudes de onda características del metal europio después de la absorción de luz por el ligando quelante con transferencia eficiente de energía al metal. El complejo quelato de europio es suficientemente estable como para resistir las condiciones de lavado típicas de los ensayos heterogéneos. En los primeros inmunoensayos de fluorescencia resueltos por tiempo, los quelatos metálicos altamente fluorescentes eran insolubles en un ambiente acuoso, en consecuencia el europio quelado por un ligando de baja transferencia de energía usado como la marca era extraído y luego se volvía a acomplejar con un ligando apropiado para formar un complejo altamente fluorescente. Más recientemente, se han sintetizado ligandos que funcionan como marcas sumamente



fluorescentes cuando forman complejos con el metal, de ese modo se elimina el paso de extracción. Se ha demostrado que ciertas proteínas acarreadoras con una multiplicidad (150) de las marcas del quelato de europio se unen a los anticuerpos a través de un puente de biotina-estreptavidina, aumentando la señal hasta 7000 veces en algunas configuraciones de amplificación.

Los derivados fosfóricos de salicilatos defosforilados por la marca fosfatasa alcalina, forman complejos de quelato ternario con el lantánido terbio (Tb^{3+}) y el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) a pH alto. Estos complejos sumamente fluorescentes se generan en una técnica de fluorescencia resuelta por tiempo que se combina con la amplificación de una marca enzimática. Las curvas dosis-respuesta para cualquier sistema de fluorescencia de resolución por tiempo descritas anteriormente son similares a los de otros inmunoensayos competitivos heterogéneos.

Técnicas de Ensayo Homogéneas

Inmunoensayo enzimático homogéneo

El primer inmunoensayo homogéneo que se reportó fue un inmunoensayo enzimático para ligandos de bajo peso molecular comúnmente conocido como la *técnica de inmunoensayo amplificado por enzima (TIAE)*. La unión de un anticuerpo específico contra el ligando marcado por la enzima cambia la actividad enzimática de la marca, de manera que la enzima unida al anticuerpo pueda distinguirse del ligando marcado no unido.

En la mayoría de los casos, la unión del anticuerpo al conjugado enzima-ligando inhibe estéricamente a la enzima al limitar el acceso del sustrato al sitio catalítico de la enzima (Fig. 13-10). Un perfil característico de inhibición de la enzima se muestra en la Fig. 13-11. El aumento en la cantidad de anticuerpo monoclonal de gentamicina inhibe la actividad de la marca enzimática glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Fig. 13-11). En la Fig. 13-12 se muestra una curva dosis-respuesta del inmunoensayo enzimático competitivo homogéneo. El ligando no marcado compite con la gentamicina marcada enzimáticamente por el número limitado de sitios de unión por anticuerpo, y a medida que se une más gentamicina no marcada al anticuerpo, la actividad enzimática aumenta. Generalmente esta respuesta se refleja mediante un cambio en la velocidad de la actividad enzimática cuando se toman dos lecturas de absorbancia de la reacción con 30 segundos de diferencia. El cambio en la absorbancia (ΔA) se usa para calcular la respuesta a la dosis.

El inmunoensayo enzimático homogéneo para la tiroxina (T_4), por otro lado, se basa en la *inversión* mediada por anticuerpo de la inhibición de la enzima malato deshidrogenasa por su ligando conjugado, la tiroxina. La tiroxina libre en la mezcla de reacción previene competitivamente la inversión por el anticuerpo; consecuentemente la actividad de la malato deshidrogenasa se reduce a medida que la concentración de tiroxina aumenta.

Otro inmunoensayo enzimático homogéneo que, al igual que la TIAE, es particularmente adecuado para los inmunoensayos de alta producción automatizados o los sistemas químicos es el inmunoensayo del donador enzimático clonado (IDEC), conocido como IDEC por sus siglas en inglés (Cloned-Enzyme Donor Immunoassay). Los componentes fundamentales del método son un aceptor de la enzima (AE) y un fragmento inactivo de β -galactosidasa que carece del fragmento donador complementario de la enzima (DE)



necesario para la actividad enzimática. Cuando el DE de 10,000 daltones se conjuga covalentemente al ligando hapténico, se convierte en el ligando marcado para este inmunoensayo competitivo para compuestos analizados de bajo peso molecular. Ambos fragmentos de β -galactosidasa son diseñados genéticamente mediante técnicas de DNA recombinante con el sitio de adhesión del ligando al DE, ubicado de tal manera que interfiera con la interacción del AE y DE. La actividad de β -galactosidasa reconstituida es cercana a la que se ve con la enzima nativa.

Cuando el ligando-DE se une con un anticuerpo específico del ligando, los eventos de complementación se inhiben parcialmente, permitiendo por lo tanto distinguir entre la marca de unión al anticuerpo de la que está libre para interactuar con el AE. En la c se muestra el desarrollo en el tiempo de la actividad de β -galactosidasa, reconstituida por complementación en presencia y ausencia de digoxina. La Fig. 13-11 ilustra que aunque esta técnica es uno de los métodos homogéneos más sensibles, la actividad en ausencia del ligando del compuesto analizado está solo parcialmente bloqueada por el complejo antiligando-anticuerpo, aún y cuando el tamaño del anticuerpo antiligando aumente por la adición de un segundo anticuerpo antiespecie para aliviar el impedimento estérico del ligando-DE unido al anticuerpo a fin de generar una enzima activa.

Sistema de inmunoensayo de reactivación por apoenzima

El sistema de inmunoensayo por reactivación de apoenzima (*SIRA*), conocido como *ARIS* por sus siglas en inglés (Apoenzyme-Reactivation Immunoassay System), es un inmunoensayo homogéneo de marca por grupo prostético. Los grupos prostéticos son los componentes no proteicos de algunas enzimas fuertemente unidos por la apoenzima proteica para modular la actividad. En algunos casos el grupo prostético y la apoenzima pueden disociarse para dejar la enzima inactiva, pero al recombinarlos se regenerará una enzima activa. El inmunoensayo de marca por grupo prostético depende de la capacidad que tiene un ligando marcado con el grupo prostético flavina adenina dinucleótido (FAD) para combinarse con apoglucosa oxidasa y regenerar la actividad de la glucosa oxidasa. La Fig. 13-14 ilustra el principio del ensayo. Como en el IDEC, el anticuerpo antiligando se une a una cantidad constante de ligando-FAD para prevenir estéricamente que el conjugado marcado con FAD se combine con el exceso de apoglucosa oxidasa, reduciendo de ese modo la cantidad de enzima regenerada activa. La inhibición de la reactivación por el anticuerpo específico del ligando se revierte en un ensayo de unión competitiva mediante la adición del ligando no marcado.

El *SIRA* se ha aplicado a pruebas de tiras de reactivo seco para el análisis de medicamentos terapéuticos. La reacción empieza cuando se aplica la muestra. La respuesta colorimétrica, proporcional a la concentración del medicamento, es monitoreada por un fotómetro de reflexión.

Inmunoensayo de polarización de fluorescencia (ver Capítulo 4, p. 100)

El inmunoensayo de polarización de fluorescencia se basa en la cantidad de luz fluorescente polarizada que se detecta al excitar el fluoróforo marca con luz polarizada. El grado de polarización de la luz fluorescente emitida depende de la velocidad de rotación del conjugado ligando-fluoróforo en la solución. Las moléculas pequeñas giran libremente, y en consecuencia se depolariza la luz fluorescente emitida por la molécula, mientras que las moléculas grandes, como las proteínas, giran más lentamente y emiten la luz fluorescente



polarizada. Cuando un anticuerpo se une a un ligando de bajo peso molecular marcado con un fluoróforo, la polarización de fluorescencia del ligando marcado aumenta porque la rotación del complejo anticuerpo-ligando marcado es mucho más lenta que la del ligando marcado solo. El ligando no marcado competirá con el ligando marcado por los sitios de unión al anticuerpo, y así la cantidad de luz fluorescente polarizada que resulta de una reacción de unión competitiva es inversamente proporcional a la concentración del ligando no marcado en la reacción. En la Fig. 13-15 se muestra el principio del inmunoensayo de polarización de fluorescencia y una curva dosis-respuesta característica.

Los inmunoensayos de polarización de fluorescencia se han desarrollado para todos los fármacos terapéuticos que se monitorean habitualmente y están comercialmente disponibles tanto para éstos como para las drogas del abuso y otras moléculas pequeñas.

Inmunocromatografía

Los inmunoensayos basados en procedimientos cromatográficos no requieren instrumentación porque la prueba puede leerse visualmente. Las marcas incluyen enzimas, partículas de látex teñidas, y soluciones de oro. Por ejemplo, las pruebas inmunocromatográficas marcadas enzimáticamente, proporcionan un resultado cuantitativo cuando se realizan del siguiente modo. Primero se mezcla una muestra con el reactivo enzimático que contiene un conjugado ligando-peroxidasa y glucosa oxidasa. Una tira de papel cromatográfico que tiene un anticuerpo inmovilizado específico del ligando en su superficie se coloca luego en la mezcla de la muestra con el reactivo enzimático, para que los reactivos líquidos puedan migrar a la tira por capilaridad. Ya que el conjugado de la enzima compite con el ligando en la muestra para unirse al anticuerpo inmovilizado, la migración del conjugado es proporcional a la concentración del ligando. Durante la migración de la mezcla de reactivos, la glucosa oxidasa se dispersa homogéneamente en toda la tira de papel. Después que la migración de reactivos y la cromatografía ha finalizado, la tira se coloca en una solución reveladora que contiene glucosa y un indicador cromogénico, el cual es oxidado con peróxido de hidrógeno (producido por la glucosa oxidasa) mediante el conjugado de peroxidasa. El color se producirá en la tira a la altura que migró el conjugado peroxidasa-ligando. La cuantificación se realiza al relacionar la altura del desarrollo de color con la concentración usando una tabla de conversión. Se han desarrollado pruebas de inmunocromatografía enzimática para medicamentos terapéuticos como la teofilina, la fenitoína, y el fenobarbital.

Inmunoensayos basados en micropartículas que dispersan la luz

Los inmunoensayos de inhibición competitiva nefelométricos y turbidimétricos varían solo en la forma de detectar la luz dispersa, como se discutió anteriormente. Estos métodos constan de un **aglutinador**, que es generalmente una sustancia acarreadora polimérica soluble en agua a la cual se acoplan diversos ligandos hapténicos. Como ejemplos de los acarreadores están el dextrán, la polisacarosa y la albúmina. El reactivo anticuerpo está compuesto de anticuerpos antiligando adsorbidos o covalentemente acoplados a micropartículas de látex menores de una micra. Para lograr mayor sensibilidad, el ligando también se acopla a partículas de látex aún más pequeñas en un ensayo de inhibiciones de dos partículas. El complejo de aglutinación que se forma cuando el aglutinador y el reactivo anticuerpo se combinan, y entonces pueden medirse cinéticamente o en un solo punto de tiempo. La presencia del ligando en el ensayo inhibe la velocidad de aglutinación al competir por los sitios de unión al anticuerpo. En la Fig.



13-16 se presenta el desarrollo del proceso de aglutinación a diferentes concentraciones de ligando en un ensayo de inhibición turbidimétrica. La densidad tanto del ligando en el aglutinador como del anticuerpo en las micropartículas de látex se optimiza para obtener una cinética máxima en ausencia del ligando y produce inhibición en su presencia. La medición de la velocidad de aglutinación al principio de la reacción produce la mayor sensibilidad, mientras que la velocidad o el punto de tiempo fijo puede tomarse en cualquier momento durante la reacción en aquellos ensayos que no requieren límites de detección bajos. La Fig. 13-17 presenta dos curvas dosis-respuesta derivadas del desarrollo de las reacciones mostrado en la Fig. 13-16

Atributos y Limitaciones de Diferentes Estrategias en los Ensayos de Unión Competitiva

Antes de describir algunas ventajas y limitaciones de los ensayos de unión competitiva descritos antes, resulta útil discutir los factores a considerarse cuando uno diseña o elige un formato particular de ensayo. Deben tomarse en cuenta la comodidad, el costo/beneficio, y el desempeño de un ensayo.

Los factores de comodidad incluyen:

- 1 Número de pasos de pipeteado
- 2 Tiempo de incubación
- 3 Ensayo de velocidad o de punto final
- 4 Necesidad de equipo adicional como incubadoras, centrífugas, o detectores especializados
- 5 Automatización y producción
- 6 Requerimientos de volumen de la muestra
- 7 Pretratamiento de la muestra (dilución, extracción, etc.)
- 8 Requisitos de control de temperatura
- 9 Costo
- 10 Tiempo del analista
- 11 Eliminación de desechos radiactivos
- 12 Aplicabilidad a una variedad de compuestos analizados
- 13 Estabilidad de los reactivos y temperaturas de almacenamiento

Obviamente, el ensayo ideal requeriría muy poca muestra sin pretratamiento, un tiempo de incubación muy corto a temperatura ambiente, ningún paso de pipeteo, y ningún equipo adicional diferentes del detector o un instrumento automatizado. Podría realizarse rápidamente, barato, con muy poco tiempo de manipulación por el operador, mínima vigilancia y tendría una capacidad de reducción rápida de datos. Los reactivos serían estables al menos durante un año a temperatura ambiente o que se puedan instalar en un sistema automatizado al menos durante 30 días.

Algunos de los factores de desempeño más importantes son los siguientes:

- 1 Buena respuesta del ensayo sobre el rango de la curva estándar.
- 2 Una baja señal de fondo (señal causada ya sea por interacciones no específicas de

- los reactivos en el ensayo o modificada por otras sustancias en los estándares o en las muestras). El ruido de fondo debe mantenerse al mínimo para maximizar los límites de detección, S/R, pendiente y el rango dinámico
- 3 La alta afinidad del anticuerpo aumenta la pendiente de la curva dosis-respuesta y contribuye a la sensibilidad y al límite de detección de un ensayo. La sensibilidad está relacionada con la pendiente de la curva dosis-respuesta, error experimental (exactitud y precisión del ensayo) y con la actividad y capacidad de detección de la marca
- 4 Una buena precisión y exactitud dependen de la exactitud de los valores usados para las concentraciones de los estándares o calibradores y de la correcta interpolación de la forma verdadera de la curva dosis-respuesta entre los estándares.
- 5 La especificidad es determinada por la capacidad del anticuerpo para discriminar entre el ligando y sustancias estructuralmente semejantes. En la mayoría de los casos, el proceso de selección y tamizaje y para los antisueros o los anticuerpos monoclonales apropiados juega una parte muy importante para determinar la especificidad del anticuerpo. Esto es válido tanto para los ligandos nativos (como proteínas) como para los inmunógenos sintéticos preparados para producir anticuerpos contra sustancias de bajo peso molecular.
- 6 Aunque algunas interferencias están relacionadas con la especificidad del anticuerpo, otras provenientes de la muestra del paciente pueden afectar los ensayos de unión competitiva ya sea homogéneos o heterogéneos, o ambos.

Por ejemplo, los ensayos homogéneos son modificados por la actividad de la enzima endógena, que es la misma que la marca enzimática, o por sustancias que interfieren en la inmunorreacción o en el paso de medición de la señal. Éstas pueden eliminarse mediante el lavado (método heterogéneo). Ambos tipos de formatos de inmunoensayo están sujetos a las interferencias del anticuerpo heterofílico de la muestra de pacientes. Los anticuerpos heterofílicos o antiespecie endógenos se pueden unir el anticuerpo del ensayo de tal manera que comprometen la señal. Por ejemplo, el anticuerpo de anti-ratón humano (AARH) se unirá a la inmunoglobulina de ratón que recubre la micropartícula de látex en un ensayo de inhibición turbidimétrica con aglutinación independiente del aglutinador, dando lugar a una señal elevada falsa. El AARH se neutraliza comúnmente mediante la inclusión de un exceso de inmunoglobulina de ratón en el ensayo.

En la Tabla 13-11 se comparan algunas características de los ensayos de unión competitiva anteriormente descritos y la Tabla 13-12 enumera algunas de las interferencias. Los ensayos heterogéneos tienen el potencial para obtener mayor sensibilidad, con límites de detección picomolares o menores. Además de las altas actividades específicas de las marcas radioisotópicas o de las marcas enzimáticas, están disponibles las marcas fluorescentes y luminescentes. Las interferencias que se originan ya sea de las sustancias en la muestra o de las impurezas en los reactivos se eliminan mediante los pasos de separación o de lavado. Al reducir la señal de fondo, el procedimiento heterogéneo también le permite a uno aumentar el volumen de muestra para incrementar la sensibilidad del ensayo.

La vida media corta de las marcas radiactivas usadas en el laboratorio clínico (como el ¹²⁵I) limita el uso de los reactivos del RIA a un intervalo de entre 6 y 12 semanas después de



recibidos. Este es un período corto comparado con los reactivos para los ensayos de marcas no isotópicas, que a menudo son estables durante un año o más. Además, los radioisótopos se consideran peligrosos y están sujetos a reglamento gubernamental para su uso y desecho.

El ELISA y los otros inmunoensayos no isotópicos tienen muchas ventajas incluida la prevención del uso de radioisótopos. Debido a que las enzimas son amplificadores bioquímicos, los sistemas que emplean marcas enzimáticas son capaces de producir una señal sumamente amplificada, dependiendo de la actividad específica de la enzima y del tiempo de incubación para la conversión del sustrato al producto. El uso de sustratos fluorogénicos o luminogénicos en vez de los cromógenos puede mejorar la sensibilidad de estos ensayos de 100 a 1000 veces.

Las desventajas del ELISA incluyen la incomodidad de los pasos necesarios de lavado comparado con los ensayos homogéneos, aunque hay instrumentos disponibles para automatizar estos pasos de lavado. Otros factores se enumeran en la Tabla 13-12.

El inmunoensayo enzimático homogéneo (técnica de inmunoensayo amplificado por enzima, TIAE), aunque limitado por la absorbancia del producto, aún es sensible a niveles subnanomolares del ligando. Como en el ELISA, la sensibilidad puede aumentarse por el uso de un sustrato fluorogénico. La TIAE y otros métodos que se determinan por absorbancia están sujetos a posibles interferencias por muestras hemolisadas, lipémicas, e ictéricas. Ya que se usa una medición de velocidad para la TIAE, es difícil realizarla manualmente pero se puede llevar a cabo rápida y fácilmente con equipo automatizado. Sin embargo, el ensayo no es apropiado para los ligandos de alto peso molecular, porque la unión al anticuerpo generalmente no proporcionará suficiente inhibición enzimática para el ligando no marcado para producir una respuesta.

Los ensayos de fluorescencia son también sensibles a concentraciones subpicomolares del ligando. Los ensayos homogéneos de fluorescencia evitan errores que pueden ser introducidos por los pasos de separación de los sistemas heterogéneos. Con la posible excepción del fluoroinmunoensayo resuelto por tiempo, que es un ensayo heterogéneo, estos ensayos de fluorescencia son propensos a las interferencias por muestras hemolisadas, lipémicas, e ictéricas. Las posibles interferencias de la muestra en los inmunoensayos homogéneos de fluorescencia incluyen dispersión de luz por lípidos y partículas, atenuación de la fluorescencia y la fluorescencia de fondo debido a la presencia de fluoróforos endógenos. El inmunoensayo de polarización de fluorescencia es sensible a la luz dispersa depolarizada de las partículas en el ensayo y requiere instrumental sofisticado. Algunos ligandos marcados pueden unirse inespecíficamente mediante las proteínas endógenas, dando lugar a un mayor ruido de fondo.

Tanto el IDEC y el SIRA amplifican la señal porque se genera una enzima activa en cada ensayo. A diferencia de otros inmunoensayos enzimáticos homogéneos, el anticuerpo se une a un conjugado de ligando marcado necesario para generar una enzima activa, en lugar de unir un ligando acoplado a una enzima que ya está activa. El IDEC, que tiene actividad muy alta debido a la generación de una marca de β -galactosidasa de alto recambio, sería más sensible y requeriría un tiempo más corto de incubación si el complejo del anticuerpo antiligando fuese un inhibidor más eficaz de la complementación donador-aceptor para generar enzimas activas. Además, los sustratos tanto fluorogénicos como luminogénicos están disponibles para β -galactosidasa, haciendo este método fácilmente adaptable a la mayor parte



del equipo automático.

Aunque el inmunoensayo de inhibición nefelométrica requiere un instrumento especial, el método de inhibición turbidimétrica es aplicable a la mayoría de los inmunoensayos y equipo clínico automatizado. Aunque quizás no es potencialmente tan sensible como el IDEC, en la práctica está usándose para cuantificar compuestos analizados de baja concentración como la T₄ y la digoxina.

Bibliografía

Ensayos de unión a ligando y de unión competitiva

Chan DW, Perlstein ET, editors: *Immunoassay, a practical guide*, New York, 1987, Academic Press.

Odell WD, Franchimont P, editors: *Principles of competitive protein binding assays*, ed 2, New York, 1983, Wiley & Sons.

Travis JC: *Fundamentals of RIA and other ligand assays*, Anaheim, Calif., 1977, Scientific Newsletter.

Voss EW Jr, editor: *Fluorescein haptens: an immunological probe*, Boca Raton, Fla., 1984, CRC Press.

Inmunoensayos (en una variedad de formatos)

Albertini A, Ekins R: *Monoclonal antibodies and developments in immunoassay*, Symposium of the Giovanni Lorenzini Foundation, vol 11, Amsterdam, 1981, Elsevier/North Holland Biomedical Press.

Diamandis EP: Detection techniques for immunoassay and DNA protein applications, *Clin Biochem* 23:437-443, 1990.

Gosling JP: A decade of development in immunoassay methodology, *Clin Chem* 36:1408-1427, 1990.

Nakamura RM, Dito WR, Tuckler ES III, editors: *Immunoassays: clinical laboratory techniques for the 1980's*, vol 4, *Laboratory and research methods in biology and medicine*, New York, 1980, Alan R Liss.

Radioinmunoensayo

Chard T: *An introduction to radioimmunoassay and related techniques*, ed 3, New York, 1987, Elsevier Science Publishing.

Inmunoensayo enzimático

Maggio ET, editor: *Enzyme-immunoassay*, Boca Raton, Fla., 1980, CRC Press.

Porstmann T, Kiessig ST: Enzyme immunoassay techniques: an overview, *J Immunol Methods* 150:5-21, 1992.

Ensayo inmunoabsorbente acoplado a una enzima (ELISA)

Avrameas S: Amplification systems in immunoenzymatic techniques, *J Immunol Methods* 150:23-32, 1992.

Butler JE, Peterman JH, Suter M, Dierks SE: The immunochemistry of solid phase sandwich enzyme linked immunosorbent assays, *Fed Proc* 46:2548-2556, 1987.

Pesce AJ, Michael JG: Artifacts and limitations of enzyme immunoassay, *J Immunol Methods* 150:111-119, 1992.

Inmunoensayo enzimático homogéneo

Henderson DR, Friedman SB, Harris JB, et al: CEDIA, a new homogeneous immunoassay system, *Clin Chem* 32:1637-1641, 1986.

Jenkins SG: Homogeneous enzyme immunoassay, *J Immunol Methods* 150:91-97, 1992.

Khanna PL, Dwarschock RT, Manning WB, Harris JD: A new homogeneous enzyme immunoassay using recombinant enzyme fragments, *Clin Chim Acta* 185:231-240, 1989.

Thompson SG, Boguslaski RC: Homogeneous dry reagent immunoassay strips for the determination of



therapeutic drugs in human serum or plasma, *J Clin Lab Anal* 1:293-299, 1987.

Inmunocromatografía enzimática

Chen R, Li TM, Merrick H, et al: An internal clock reaction used in a one-step enzyme immunochromatographic assay of theophylline in whole blood, *Clin Chem* 33:1521-1525, 1987.
Zuk RF, Ginsburg VK, Houts T, et al: Enzyme immunochromatography\Ma quantitative immunoassay requiring no instrumentation, *Clin Chem* 31:1144-1150, 1985.

Inmunoensayo de interferencia

Graves SW, Sharma K, Chandler AB: Methods for eliminating interferences in digoxin immunoassays caused by digoxin-like factors, *Clin Chem* 32:1506-1509, 1986.
Levinson SS: The nature of heterophilic antibodies and their role in immunoassay interference, *J Clin Immunoassay* 15:108-115, 1992.
Pesce AJ, Michael JG: Antifacts and limitations of enzyme immunoassay, *J Immunol Methods* 150:111-119, 1992.
Valdes R Jr, Miller TI: Increasing the specificity of immunoassays, *J Clin Immunoassay* 15:87-96, 1992.

Inmunoensayo de fluorescencia

Visor GC, Shulman SG: Fluorescence immunoassay, *J Pharm Sci* 70:469-475, 1981.

Inmunoensayo de polarización de fluorescencia

Dandliker WB, Kelly RJ, Dandliker J, et al: Fluorescence polarization immunoassay: theory and experimental method, *Immunochemistry* 10:215-227, 1973.

Inmunoensayo de fluorescencia tardía

Diamandis EP: Multiple labeling and time-resolvable fluoróforos, *Clin Chem* 37:1486-1491, 1991.
Soini E, Kojola H: Time-resolved fluorometer for lanthanide chelates\Ma new generation of nonisotopic immunoassays, *Clin Chem* 29:65-68, 1983.
Papanastasiou-Diamandis A, Christopoulos TK, Diamandis EP: Ultrasensitive thyrotropin immunoassay based on enzymatically amplified time-resolved fluorescence with a terbium chelate, *Clin Chem* 38:545-548, 1992.

Ensayos de dispersión de luz

Newman DJ, Henneberry H, Price CP: Particle enhanced light scattering immunoassay, *Ann Clin Biochem* 29:22-42, 1992.

Inmunoensayos de luminescencia

Kricka LT: Chemiluminescent and bioluminescent techniques, *Clin Chem* 37:1472-1481, 1991.
Maeda M, Shimizu S, Tsuji A: Chemiluminescence assay of b-d-galactosidase and its application to competitive immunoassay for 17-hydroxyprogesterone and thyroxine, *Anal Chim Acta* 266:213-217, 1992.

Tablas

Tabla 13-1. Proteínas de unión específica presentes en la sangre u otros tejidos

Proteína de unión	Ligando
-------------------	---------



Anticuerpos	Antígenos variados
Globulina fijadora de corticosteroide (GFC)	Cortisol, corticoesterona
Receptor de estrógeno	Estrógeno
Factor intrínseco	Vitamina B ₁₂
Globulina fijadora de tiroxina (GFT)	Tiroxina (T ₄)
	Triyodotironina (T ₃)
Receptor de vitamina D	1-",25-Dihidroxivitamina D ₃

Tabla 13-2. Técnicas para separar proteína-unida de ligando marcado libre

Técnica	Principio
Adsorbentes	
No específico	Los ligandos de bajo peso molecular son adsorbidos por partículas como el carbón vegetal y removidos por centrifugación.
Específico	Los anticuerpos contra el ligando o contra el anticuerpo unido por ligando se inmovilizan en la superficie de una matriz sólida como fibra de vidrio, micropartículas de látex, micropartículas magnéticas, membranas, o plástico. El complejo inmovilizado del anticuerpo-ligando se separa del ligando no unido por decantación, lavado, filtración, difusión o centrifugación.
Cromatografía	El ligando unido por proteína se mueve a través del medio cromatográfico a una velocidad diferente a la del ligando libre. Un comportamiento similar puede ocurrir con películas de varias capas.
Precipitación por sulfato de amonio	El ligando unido por anticuerpo es precipitado por el sulfato de amonio (técnica de Farr).
Doble anticuerpo	El ligando unido por anticuerpo se precipita mediante la adición de un segundo anticuerpo específico para el anticuerpo en el complejo anticuerpo-ligando o anticuerpo-antígeno.

Tabla 13-3. Algunas marcas para las ensayos de unión competitiva

Marca	Detector
Enzimas	
Sustratos cromogénicos	Espectrofotómetro
Sustratos fluorogénicos	Fluorómetro
Sustratos luminogénicos	Luminómetro
Grupos prostéticos de la enzima	Espectrofotómetro, fluorómetro
Sustratos enzimáticos	Espectrofotómetro, fluorómetro,

Fluoróforos, fluorógenos	luminómetro
Micropartículas	Fluorómetro
Isótopos radiactivos *	Espectrofotómetro, nefelómetro
	Contador de radiactividad
* Utilizable solo en los ensayos heterogéneos.	

Tabla 13-4. Radioisótopos usados en los ensayos de unión competitiva

Isótopo	Emisión	Actividad específica máxima* (Ci/g)	Vida media	Contador γ
H	Beta	9.6×10^3	12.3 años	CL
^{14}C	Beta	4.5	5730 años	CL
^{32}P	Beta	2.85×10^5	14.2 días	CL
^{125}I	Gama	1.74×10^4	60 días	Cristal
^{57}Co	Gama	8.48×10^3	270 días	Cristal
<p>* El curie (Ci) es una unidad de radiactividad igual a 3.7×10^{10} desintegraciones por segundo.</p> <p>γ Los emisores de partículas beta se cuentan en los contadores de centelleo líquido (CL) mediante la liberación de fotones del fósforo orgánico en la solución. Los emisores de rayos gama se cuentan en detectores con un cristal de yoduro de sodio que contiene flúor del cual se liberan los fotones.</p>				

Tabla 13-5. Fluoróforos usados como marcas en los ensayos de unión competitiva

Fluoróforo	Longitud de onda de excitación (nm)	Longitud de onda de emisión (nm)	ϵ^*	Rendimiento cuántico de fluorescencia γ
*				
Quelato de europio γ	340	613	90,000	>0.95
Fluoresceína	490	520	72,000	0.85
β -Ficoeritrina β	488	576	2,400,000	0.98
Rodamina	550	585	50,000	0.70
Umbeliferona	380	450	20,000	0.50
<p>ϵ^* es la absorbancia de una solución de 1 M a través de una trayectoria de luz de 1 cm</p> <p>γ El rendimiento cuántico de fluorescencia es relativo al rendimiento cuántico de la acridina, que es 1.0.</p>				



☞ Quelato de Europio: β -dicetona
☞ β -Ficoeritrina es una ficobiliproteína de 240,000 daltones.

Tabla 13-6. Unión de reactivos cruzados como una función de la afinidad del anticuerpo

Anticuerpo	Especies unidas	K_a	Concentración (M) requerida para el 50% de unión *
1	Ligando ₁	1×10^8	2×10^{-8}
	Reactivo cruzado _a	1×10^7	2×10^{-7}
	Reactivo cruzado _b	5×10^7	1×10^{-6}
2	Ligando ₂	1×10^{10}	2×10^{-10}
	Reactivo cruzado _c	2×10^8	4×10^{-8}
	Reactivo cruzado _d	1×10^6	2×10^{-6}
Cuando el 50% del ligando o del reactivo cruzado está unido, $U/L = 1$. Ya que $K_a = U/L[Ac]$; Cuando $U/L = 1$, la $K_a = 1/[Ac]$			

Tabla 13-7. Reactividad cruzada de cafeína con anticuerpos policlonales o monoclonales contra teofilina.

	<u>Concentración (M) cuando 50% de la marca está unida</u>		
	Teofilina	Cafeína	% de reactividad cruzada
Policlonal	1.29×10^{-7}	1.05×10^{-6}	12.3
Monoclonal	6.15×10^{-8}	5.09×10^{-6}	1.2

Tabla 13-8. Determinaciones de reactividad cruzada funcionales y clásica para un anticuerpo monoclonal antiteofilina

Reactivo cruzado	Clásico *	%	Funcional γ	%
	$\mu\text{g/mL}$		$\mu\text{g/mL}$	
1,3,7-trimetilxantina (cafeína)	>10,000	<0.2	400	0.8



3,7-dimetilxantina (teobromina)	760	2.8	390	0.8
ácido 1,3-dimethylúrico	2,900	1.0	580	0.5
3-metilxantina	760	2.8	280	1.1

*La reactividad cruzada clásica es determinada según se describe en la Ec. 13-4. La concentración de teofilina al 50% de unión fue 21.3 µg/mL.

∴ La reactividad cruzada funcional está definida por la concentración de reactivo cruzado que aumenta la concentración observada de 15 µg del control de teofilina/mL en un 20%. Por consiguiente, la reactividad cruzada funcional se calcula del siguiente modo:

$$\% \text{ de reactividad cruzada} = (100) \frac{3 \mu\text{g de teofilina/mL} \dots\dots\dots}{\mu\text{g de reactivo cruzado/mL con 20\% de sesgo}}$$

Tabla 13-9. Datos para la radiactividad del RIA de amikacina *

Dosis de Amikacina (M x 10 ⁸)	cpm unidas totales (TU)*	cpm unidas * específicamente (U) ∴	%B ∴	U/L	U/U ₀	Logit U/U ₀
0	14019	13588 (B ₀)	64.0	1.78	1.00	---
1.07	10694	10264	48.4	0.94	0.76	1.13
2.14	9235	8805	41.5	0.71	0.65	0.61
4.28	7184	6754	31.8	0.47	0.50	-0.01
8.56	5360	4930	23.2	0.30	0.36	-0.56
17.12	3925	3495	16.5	0.20	0.26	-1.06
Desconocido 1	18912	8482	40.0	0.67	0.62	0.51
Desconocido 2	6910	6480	30.5	0.44	0.48	-0.09
Desconocido 3	4340	3910	18.4	0.23	0.29	-0.91

* Las cuentas totales por minuto (cpm), T, de ¹²⁵I-amikacina en cada reacción son 21,225; las cuentas no específicamente unidas (UNE) por minuto son 430.

∴ Cpm unidas específicamente = U = cpm totales unidas - UNE.

∴ % unido = (U/T) 100

L U/L = U/TU - U

||U₀ = U a la dosis cero del medicamento.

Tabla 13-10. Marcas enzimáticas para los inmunoensayos

Enzima	Fuente	Peso molecular	Actividad	
			Tasa de recambio *	°C
Fosfatasa alcalina	Intestino de ternera	140,000	420,000	37

β -Galactosidasa	<i>Escherichia coli</i>	540,000	324,000	37
Glucosa oxidasa	<i>Aspergillus niger</i>	186,000	53,700	25
Glucosa-6-fosfato	<i>Leuconostoc</i>			
Deshidrogenasa	<i>mesenteroides</i>	130,000	93,600	30
Peroxidasa	Rábano	40,000	220,000	25
Ureasa	Frijol	540,000	450,000	25
* La tasa de recambio es el número de moles de producto liberado por minuto por mol de enzima a la temperatura designada.				

Tabla 13-11. Características de algunos ensayos de unión competitiva

Immunoensayo	Homogéneo o Heterogéneo	Límite de detección	Amplificación	Ligandos de bajo o alto PM
RIA	Heterogéneo	10^{-11} a 10^{-15}	10^{-12} a 10^{-14}	Ninguna
Ambos				
ELISA	Heterogéneo	10^{-11} a 10^{-15}	Sí	Ambos
TIAE	Homogéneo	5×10^{-10}	Sí	Bajo
IDEC	Homogéneo	10^{-10}	Sí	Bajo
Dispersión de luz	Homogéneo	10^{-10}	Ninguna	Bajo
IPF	Homogéneo	5×10^{-9}	Ninguna	Bajo
Immunoensayo de fluorescencia de resolución tardía	Heterogéneo	10^{-12}	Ninguna	Ambos
SIRA	Homogéneo	5×10^{-10}	Sí	Ambos
SIRA, sistema de immunoensayo de reactivación por apoenzima-; IDEC, immunoensayo del donador enzimático clonado; ELISA, ensayo immunoabsorbente por unión a enzima; TIAE, técnica de immunoensayo amplificado por enzima; IPF, immunoensayo de polarización de fluorescencia; PM, peso molecular; RIA, radioimmunoensayo.				

Tabla 13-12. Algunas limitaciones potenciales e interferencias de immunoensayos

Tipo de ensayo	Interferencias/limitaciones	Efecto en la respuesta del ensayo
----------------	-----------------------------	-----------------------------------



Homogéneo	Deformación del antígeno o anticuerpo o impedimento estérico en la fase sólida Unión no específica del conjugado marcado a las superficies sólidas Remoción del aglutinante adsorbido Conjugación del ligando o anticuerpo vs. la enzima reduce su actividad Aumento de la marca enzimática incrementa la <i>UNE</i> Contaminación de europio con quelatos marcados con fluorescencia resuelta por tiempo	Pérdida de afinidad y capacidad de unión; reduce la sensibilidad Baja <i>S/R</i> , sensibilidad, límite de detección Pérdida de capacidad de unión con el tiempo; mejora la respuesta competitiva Señal reducida que se compensa con tiempos mayores de incubación Baja <i>S/R</i> , sensibilidad, límite de detección Aumento en el ruido de fondo, baja <i>S/R</i>
Heterogéneo	Aumento del ruido de fondo de la muestra debido a factores endógenos: <ul style="list-style-type: none">· Fluorescencia· Actividad enzimática· Interferencias espectrales· Materiales similares a las marcas· Anticuerpos contra la marca Imprecisión	Baja <i>S/R</i> atenuada por la dilución (que también reduce la sensibilidad) o por mediciones cinéticas, sí procede) Reducción en la señal, podría interferir con la unión del anticuerpo del conjugado del ligando Aumento del ruido total, por tanto reduce <i>S/R</i>
General	Sustancias exógenas <ul style="list-style-type: none">· Anticoagulantes Sustancias endógenas <ul style="list-style-type: none">· Reactivos cruzados, metabolitos· Anticuerpos heterofílicos, AARH, factor reumatoide	Inhibe la actividad enzimática Aumenta respuesta de la señal Se une al anticuerpo del antiligando para estimular o interferir con la respuesta normal

AARH, anticuerpo anti-ratón humano; *UNE*, unión no específica; *S/R* relación señal a ruido

Figuras

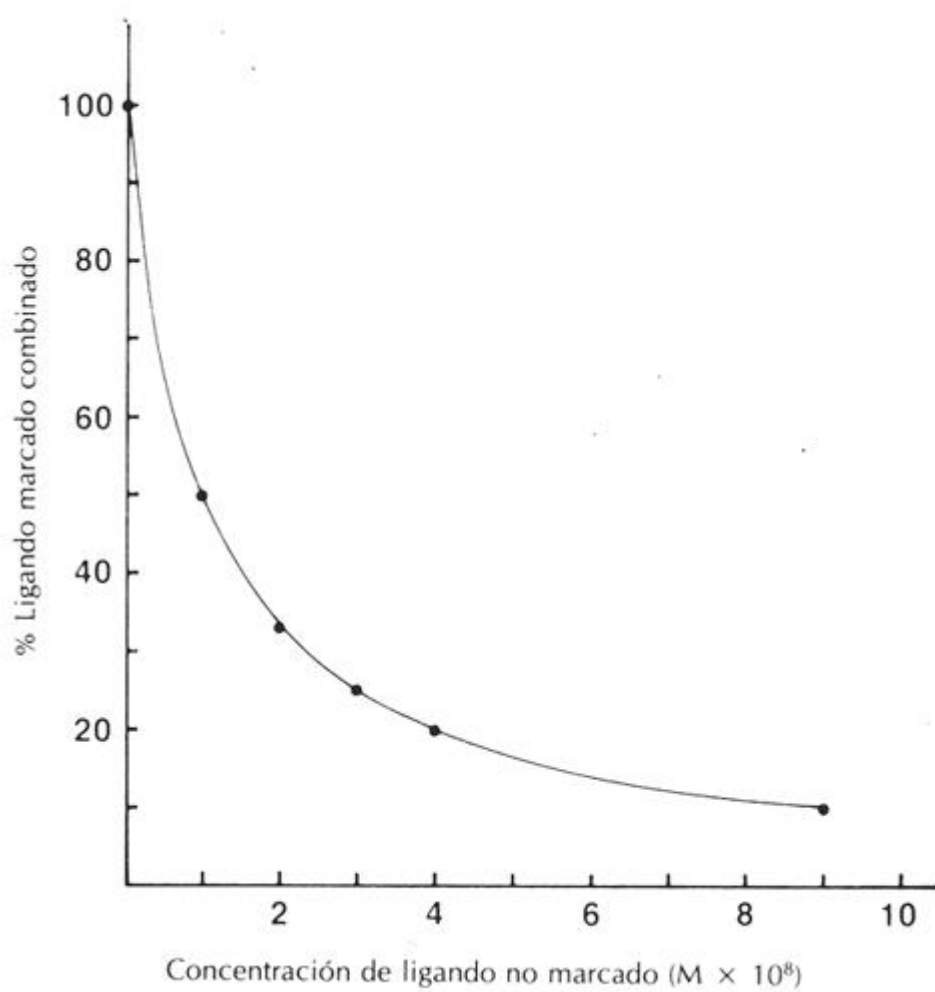


Figura 13-1 Curva dosis respuesta para un ensayo de unión competitiva a proteína.

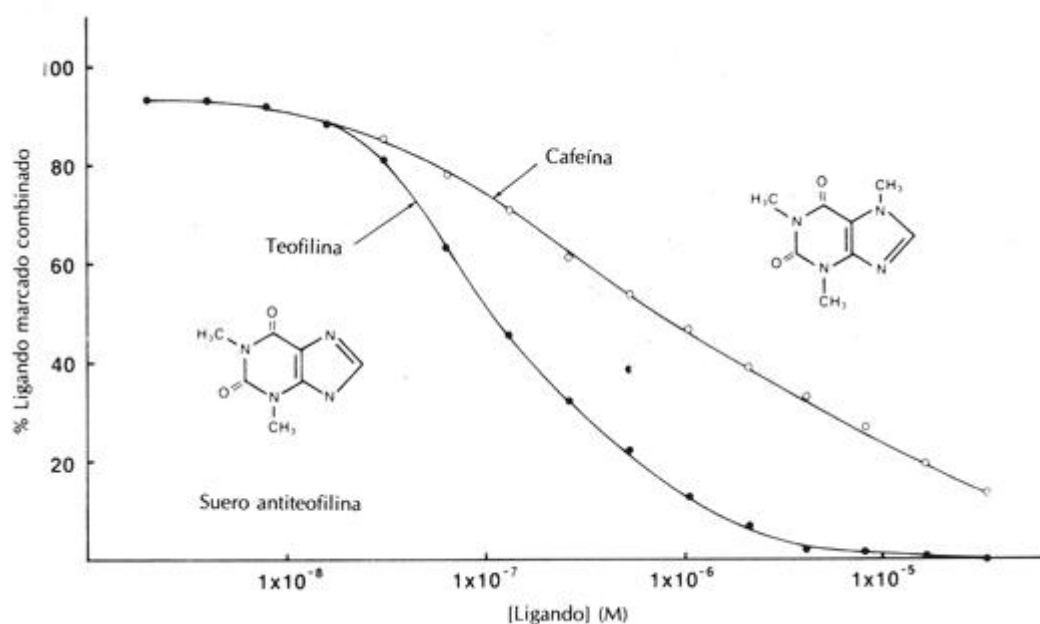


Figura 13-2 Reactividad cruzada de cafeína con un anticuerpo policlonal contra teofilina en un ensayo fluorescente homogéneo. La reactividad cruzada se determina a concentraciones de teofilina cafeína requeridas para el 50% de la dosis de respuesta. Ésta es equivalente al 46.5 % de la marca unida. Ver Tabla 13-7 para los datos de reactividad cruzada.

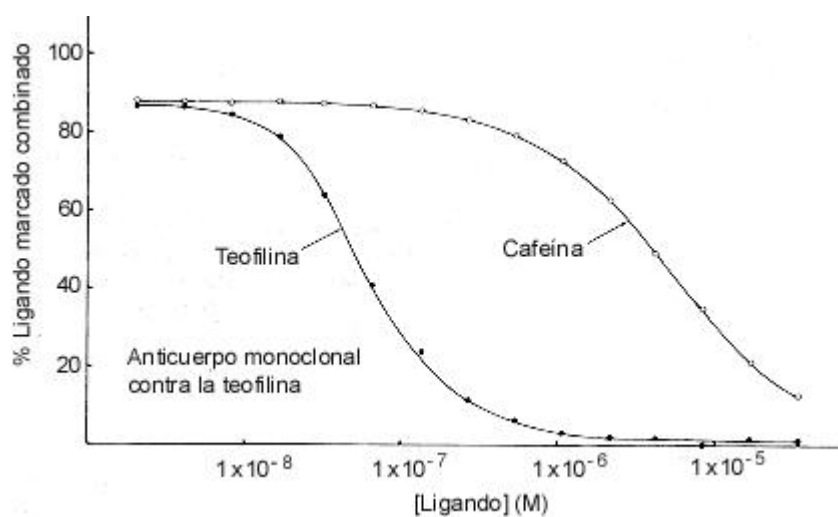


Figura 13-3 Reactividad cruzada de cafeína con anticuerpos policlonales o monoclonales contra teofilina en el mismo ensayo. La reactividad cruzada es determinada al 42 % de la marca unida.

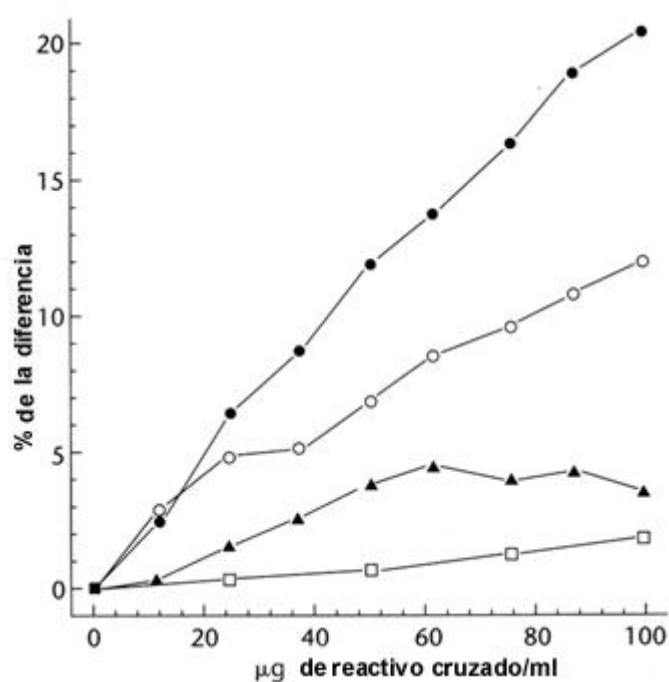


Figura 13-4 Determinación funcional de la reactividad cruzada en un ensayo de inhibición turbidimétrica homogéneo. El incremento observado en concentración aparente con respecto a un control de un rango medio está medido en presencia de concentraciones crecientes de ácido 1,3-dimetilúrico, ③; 1-metilxantina, ⑩; 3-metilxantina, ④; y cafeína, Ž.

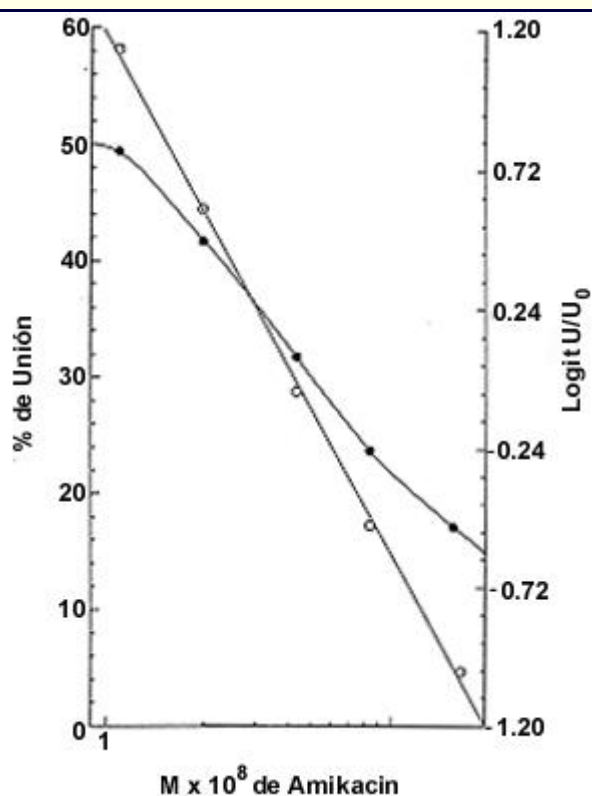


Figura 13-5 Curvas dosis-respuesta de un radioinmunoensayo de amikacin con el porcentaje de ^{125}I -amikacina unido, \bar{Z} y logit (U/U_0), $\textcircled{4}$, graficado como una función del logaritmo de la concentración de amikacina.

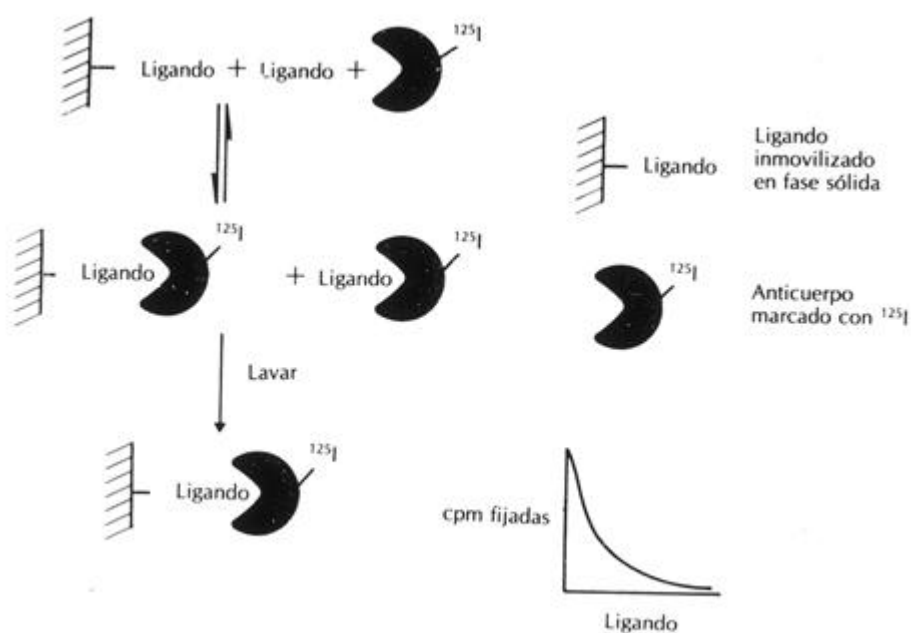


Figura 13-6 Principio del ensayo inmunoradiométrico competitivo y una curva dosis-respuesta típica.

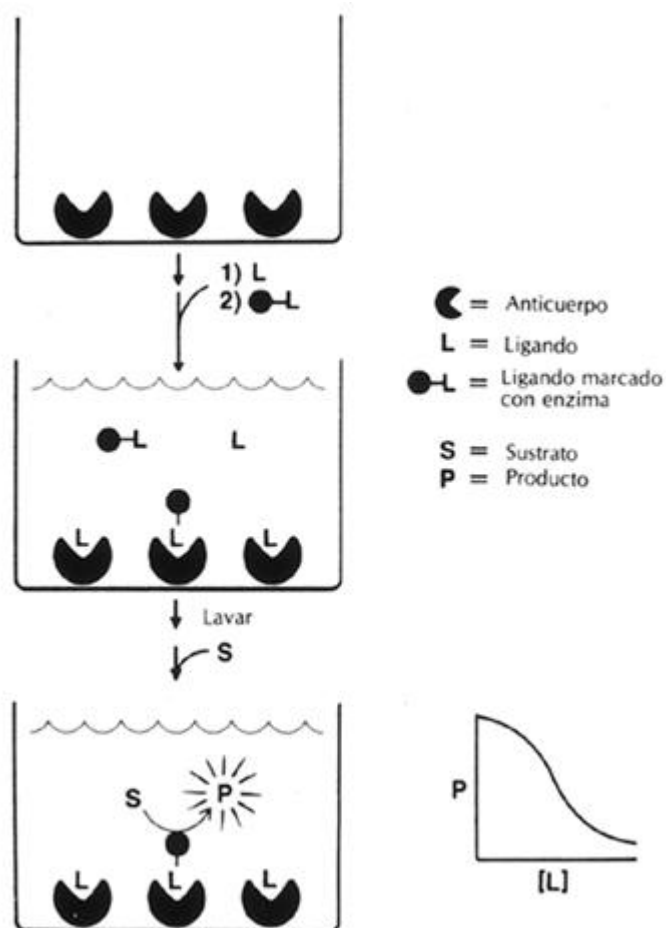


Figura 13-7 Principio del ensayo competitivo inmunoabsorbente unido a enzima (ELISA) con el ligando marcado con una enzima y una curva dosis-respuesta típica.

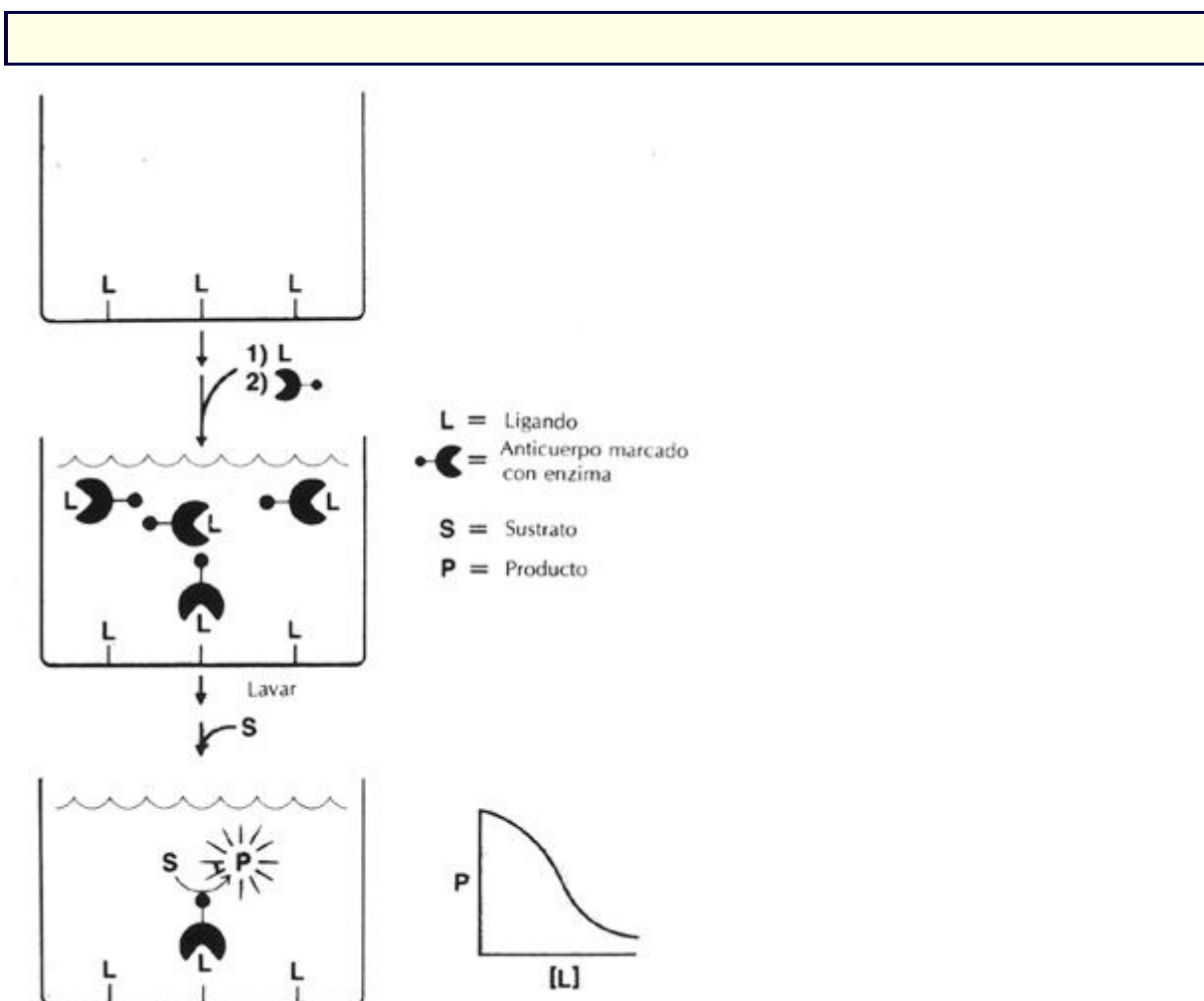


Figura 13-8 Principio del ELISA competitivo donde el anticuerpo está marcado con una enzima. Este es un ensayo inmunométrico.

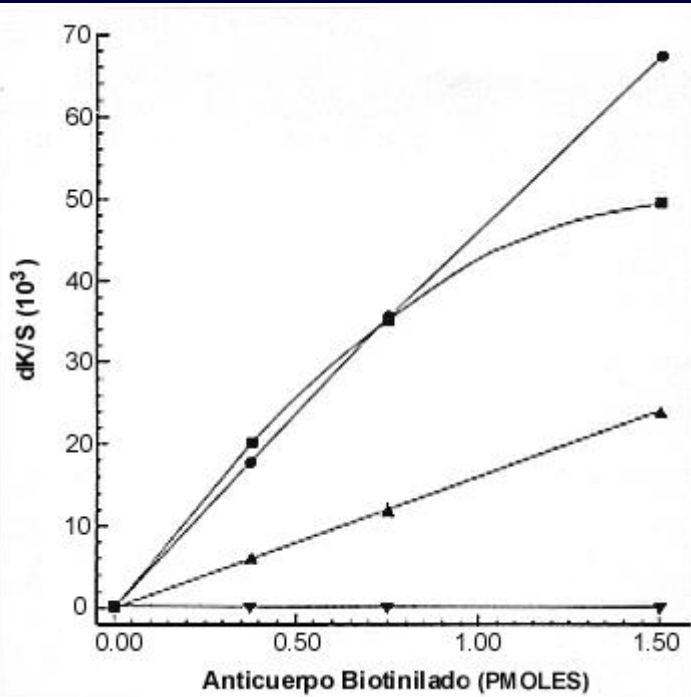




Figura 13-9 Captura de un anticuerpo antipéptido biotinilado en términos de la densidad de biotina en un ensayo de captura indirecto, donde d/K es una medición de la luz reflejada. La estreptavidina, inmovilizada a micropartículas de látex biotinilado, se incuba simultáneamente con una cantidad creciente de anticuerpo biotinilado conteniendo 1.2, 4.3, 6.0, o 10.7, biotinas por molécula de anticuerpo respectivamente y una concentración constante del conjugado fosfatasa alcalina-péptido. El complejo es retenido en un filtro de fibra de vidrio y se lava antes de la adición del sustrato.



-  = Ligando marcado con enzima
-  = Anticuerpo
- L = Ligando
- S = Sustrato
- P = Producto

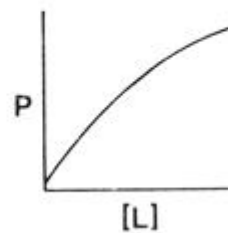


Figura 13-10 Principio del inmunoensayo enzimático homogéneo (técnica de inmunoensayo enzimático amplificado, TIAE) y una curva dosis-respuesta típica.

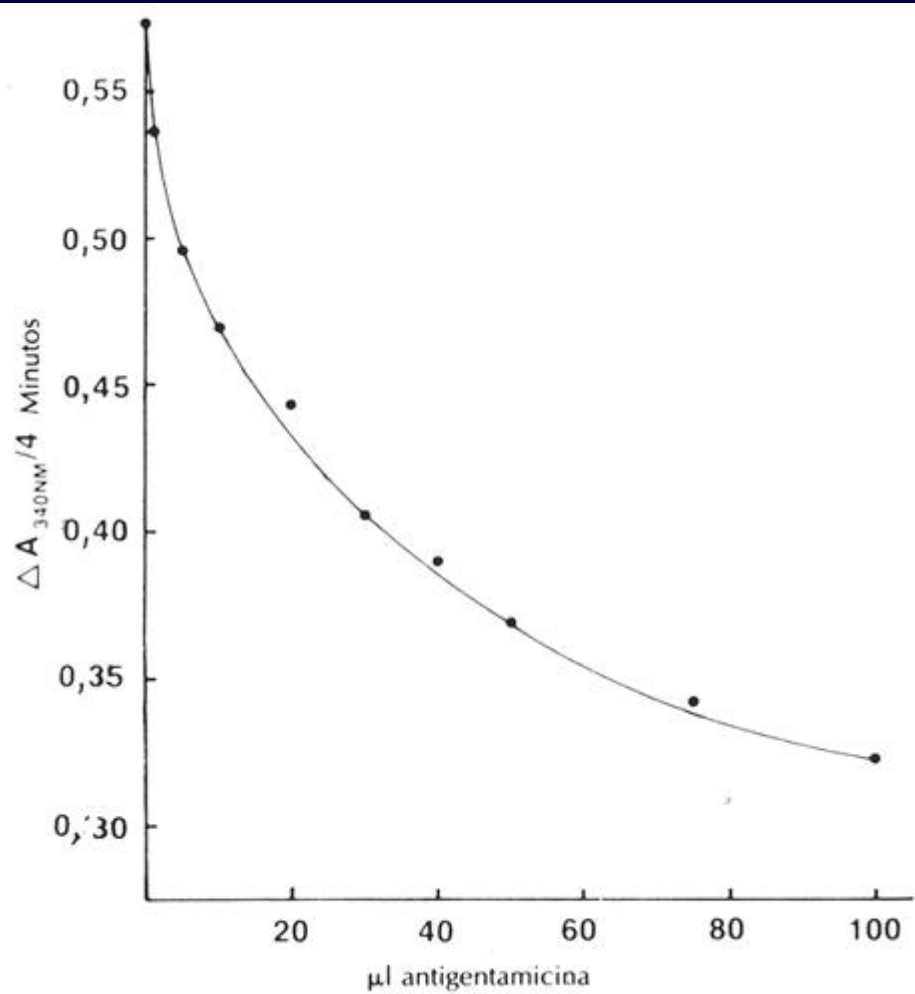


Figura 13-11 Inhibición de la actividad del conjugado glucosa-6-fosfato deshidrogenasa-gentamicina por un anticuerpo monoclonal contra gentamicina.

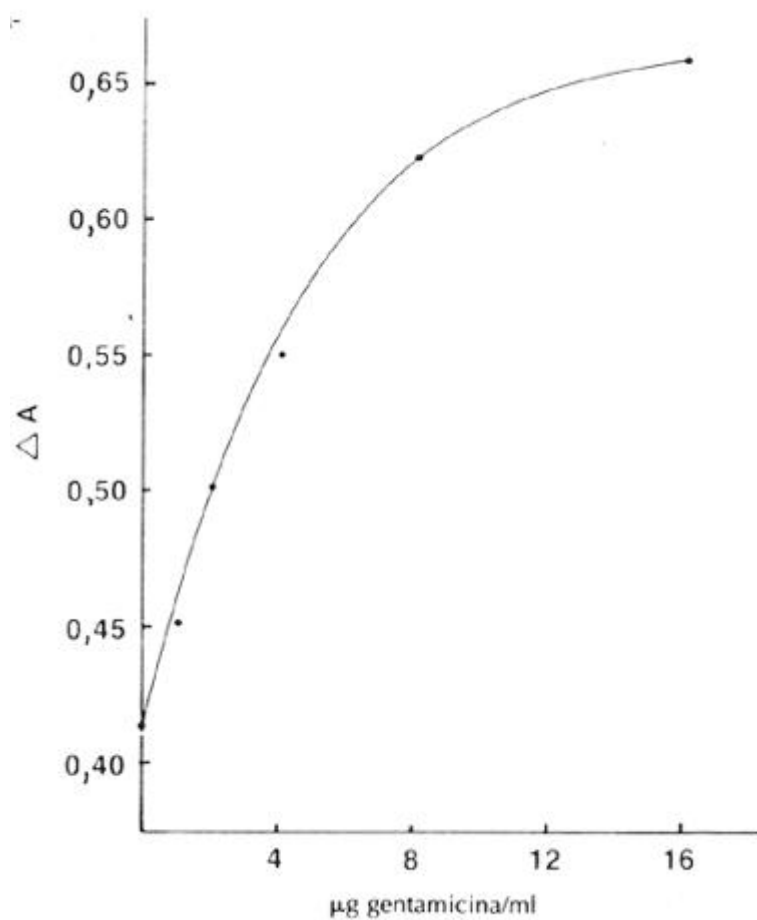


Figura 13-12 Curva dosis-respuesta del inmunoensayo enzimático homogéneo a gentamicina.

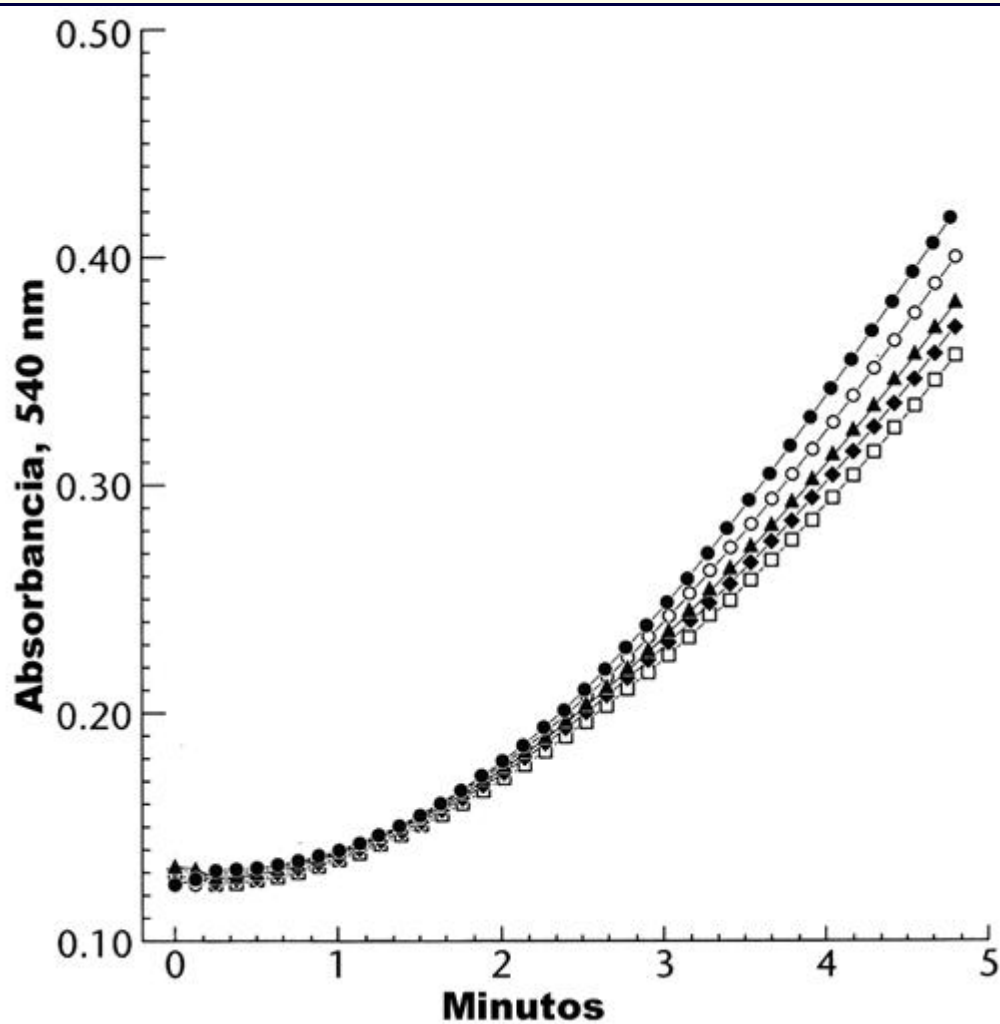


Figura 13-13 Desarrollo del tiempo de reacción para el método de ensayo de digoxina del inmunoensayo de la enzima donadora clonada. La respuesta estriba en la ausencia, ∞ , y presencia de 1.0, \otimes ; 2.0, \odot ; 3.0, \odot ; y 4.0 ng, \oplus , de digoxina por mililitro de la muestra.

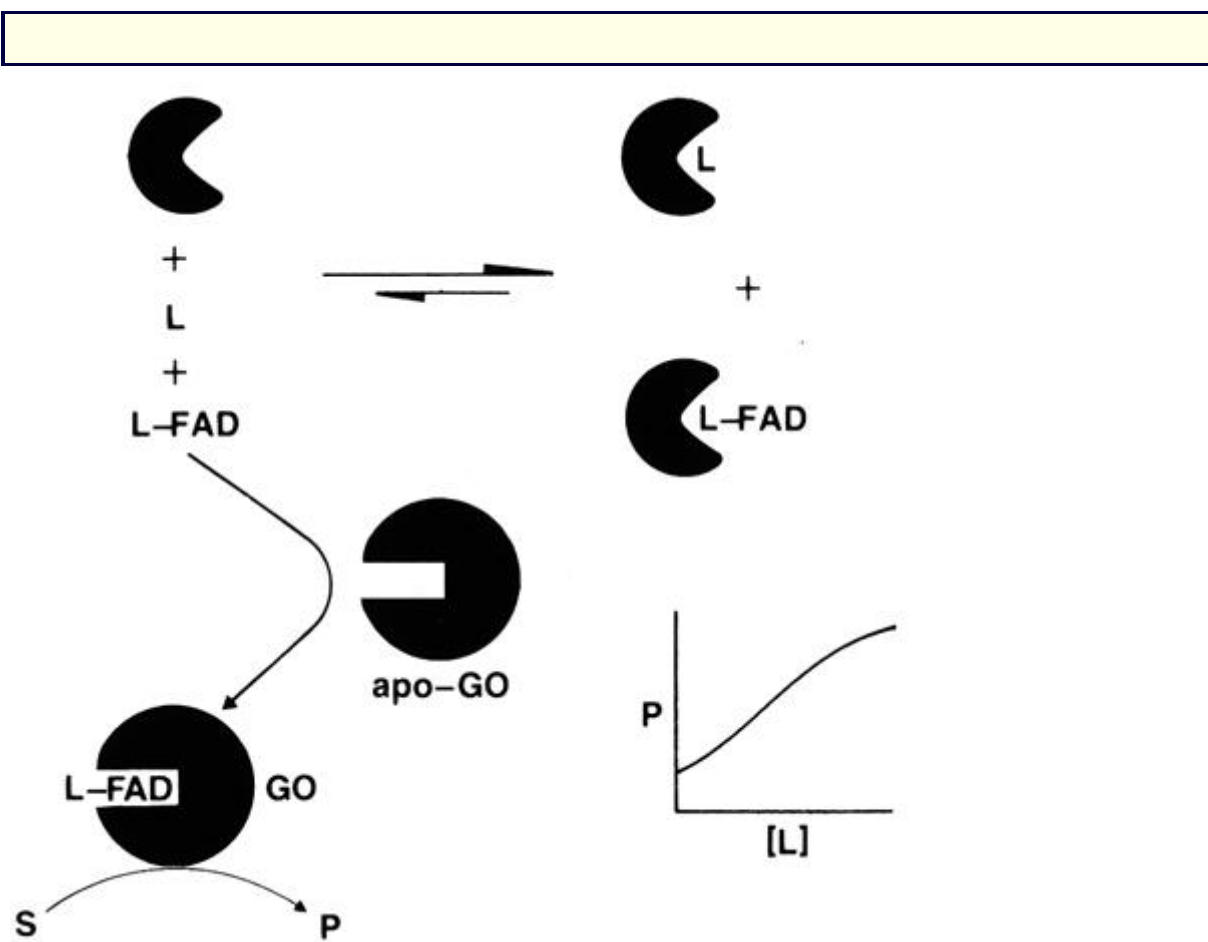


Figura 13-14 Principio del sistema de inmunoensayo de reactivación de apoenzima (SIRA) y una curva dosis-respuesta típica. El ligando L, compite con el ligando flavina adenina dinucleotido marcado, L-FAD, por sitios de unión al anticuerpo. El L-FAD que no se une está libre para reaccionar con oxidasa de apoglucosa, apo-GO, para generar una enzima activa.

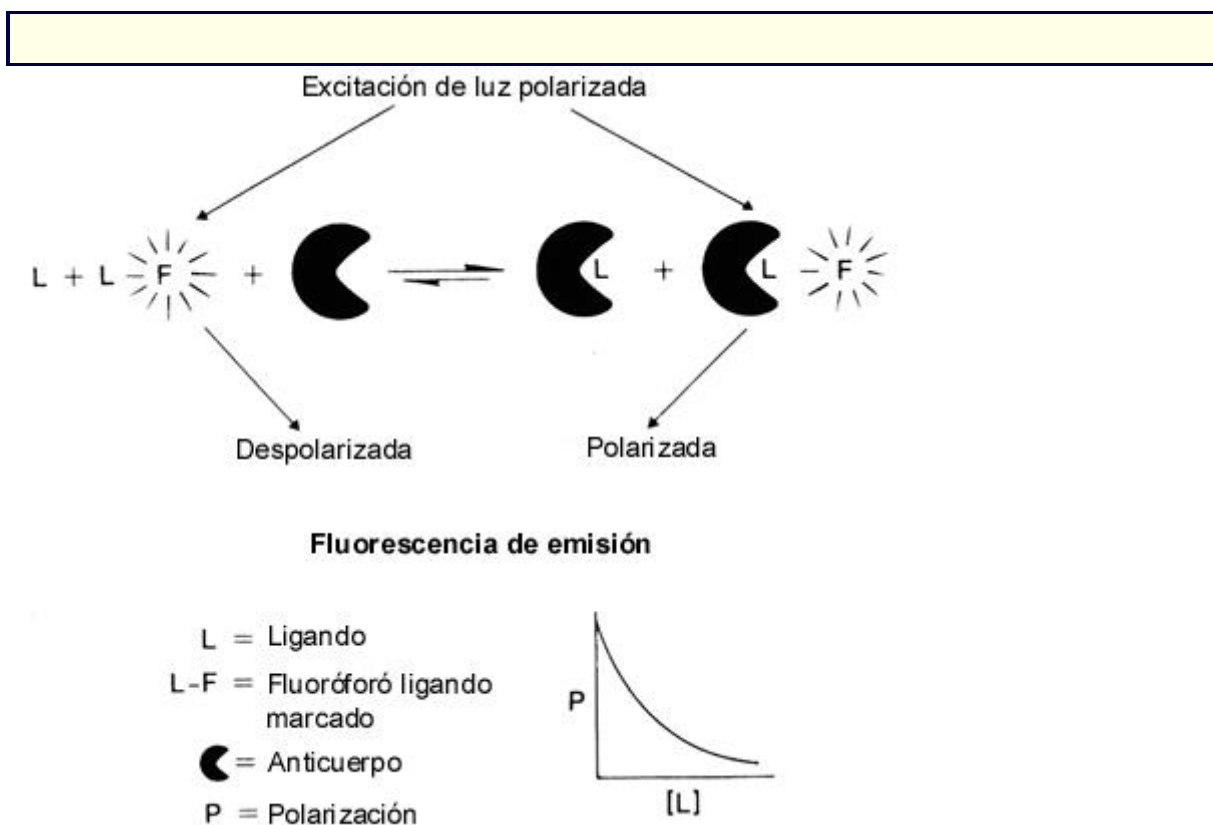


Figura 13-15 Principio del inmunoensayo de polarización de fluorescencia (IPF) y una curva dosis-respuesta típica.

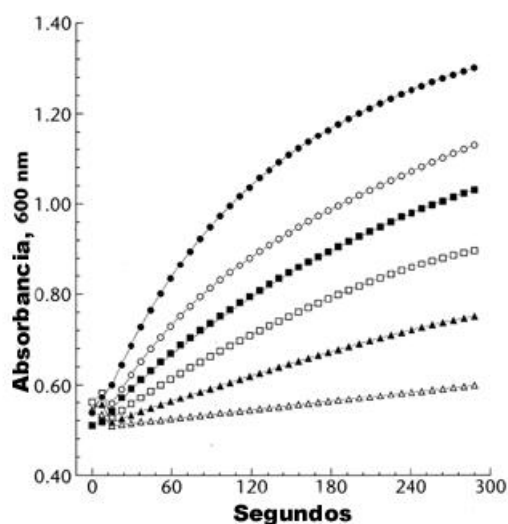


Figura 13-16 Curvas de los tiempos de reacción para un inmunoensayo de inhibición turbidimétrica a teofilina en ausencia, ③ y presencia de 2.5, ④; 5.0, ⑤; 10.0, ⑥; 20.0, ⑦; y 40.0, ⑧, ng de teofilina por mililitro de la muestra.

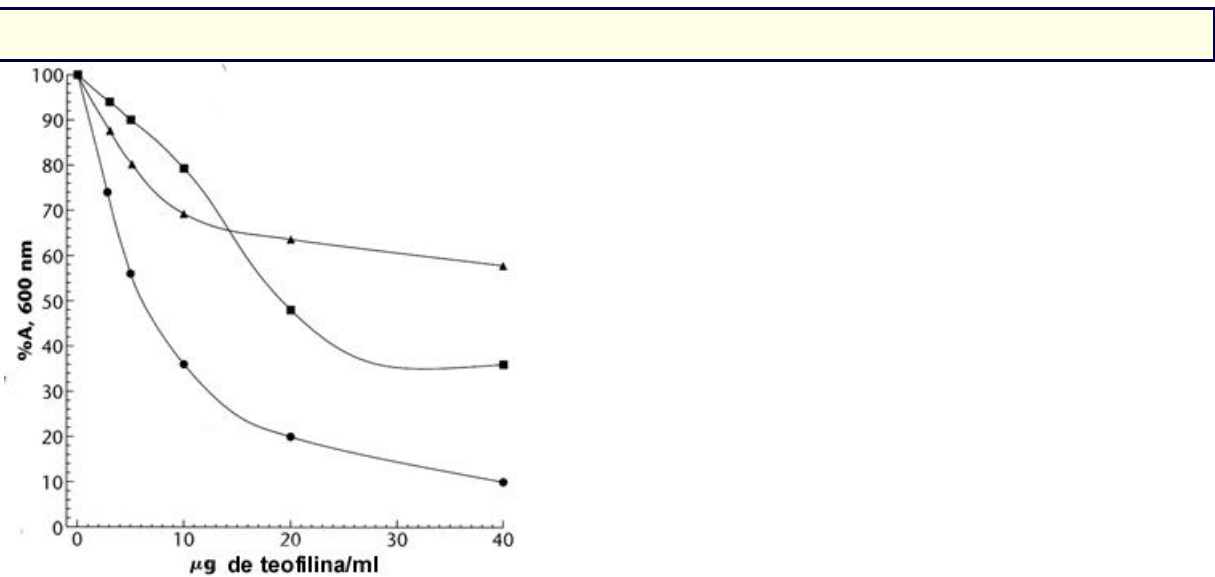


Figura 13-17 Curvas dosis-respuesta del ensayo de inhibición turbidimétrica a teofilina derivadas de las respuestas cinéticas que se muestran en la Fig. 13-16. Se tomaron las velocidades entre 30 y 45 segundos, ③, y entre 270 y 285 segundos, ⑤. También se muestra la respuesta a la dosis para un punto de tiempo fijo en 285 segundos, ⑩. Las respuestas respectivas se normalizaron al 100% por motivos de escala.

CAPÍTULO 14

14. Medición de las Propiedades Coligativas

Lawrence A. Kaplan

Propiedades coligativas

- Osmosis
- Osmolalidad
- Osmometría
- Brecha osmolal

Uso clínico de la Osmometría

- Osmolalidad plasmática
- Osmolalidad urinaria
- Osmolalidad fecal
- Osmolalidad sérica o plasmática

Principios de la medición

- Descenso del punto de congelación
- Descenso de la presión de vapor

Presión osmótica coloidal

- Definiciones



Uso clínico de la presión osmótica coloidal

Medición de la presión osmótica coloidal

OBJETIVOS

- ♦ Identificar la relación entre ósmosis, presión osmótica, osmolalidad y osmometría.
- ♦ Listar cuatro mediciones que dependan de las propiedades coligativas y describir qué sucede con cada propiedad durante la concentración de la muestra.
- ♦ Establecer la relación entre el abatimiento del punto de congelación y las moles de partículas disueltas por Kg de agua y calcular la osmolalidad a partir del punto de congelación de una solución.
- ♦ Describir las técnicas del descenso del punto de congelación y descenso de la presión de vapor para la determinación de la osmolalidad.
- ♦ Establecer la utilidad clínica de la determinación de la osmolalidad del plasma y de la orina. Establecer las situaciones clínicas en las que la medición de la brecha osmolal es útil.

Términos clave

ascenso del punto de ebullición: Fenómeno en el que la adición de moléculas de soluto eleva la temperatura a la que hervirá la solución. Para el agua es de 1,86 grados centígrados por mol de soluto en un Kg de solvente.

actividad: Concentración efectiva de las moléculas de una solución.

brecha osmolal: Diferencia entre la osmolalidad sérica observada y la calculada. Los valores de osmolalidad calculados comprenden la concentración de sodio multiplicada por 2, más la glucosa y el nitrógeno urémico.

coloide: Macromolécula, generalmente en solución acuosa. Normalmente este término se aplica a soluciones de proteínas.

cuerpos cetónicos: Acetona y otras cetonas presentes en el suero de pacientes con cetoacidosis diabética.

crystaloides: Moléculas no cargadas de soluto en una solución.

descenso de la presión de vapor: Fenómeno en el que la adición de un soluto a un solvente disminuirá la cantidad de solvente en equilibrio entre la fase vapor y la fase líquida.

descenso del punto de congelación: Fenómeno en que la adición de moléculas de soluto a una solución disminuye la temperatura a la que la solución congelará.

difusión: Mezclado de las moléculas como resultado de su movimiento al azar.

efecto Donnan: Distribución de iones debida a la presencia de un ion de alto peso molecular de un lado de una membrana semipermeable.

efecto Seebeck: Diferencia de voltaje que se observa cuando los extremos de un alambre especialmente diseñado están a 2 temperaturas diferentes.

expansor de plasma: Normalmente es un dextrano de alto peso molecular que se administra por vía intravenosa para elevar la presión oncótica de un paciente.

membrana semipermeable: Barrera que permite pasar a un tipo de molécula, como el agua y no a otro, como una proteína.

molalidad: Número de moles de soluto por Kg de agua o solvente.

osmolalidad: Medida del número de moles de partículas por Kg de agua.

osmometría: Medida de una propiedad coligativa de una solución en la que se determina el

número de moles de un soluto por unidad de volumen.

ósmosis: Flujo de agua a través de una membrana semipermeable.

presión osmótica: Presión hidrostática requerida para prevenir un cambio en volumen cuando se colocan 2 soluciones de diferente concentración en lados opuestos de una membrana semipermeable.

presión osmótica coloidal (POC): Presión osmótica generada por el componente de una solución de alto peso molecular (mayor que 30,000 daltones).

presión oncótica: Sinónimo de presión osmótica coloidal.

propiedad coligativa: Característica a la que contribuyen todas las moléculas de una solución, cualquiera que sea su composición individual o naturaleza.

punto de rocío: Temperatura a la que condensa el agua a partir de vapor.

termistor: Aparato para medir la temperatura en el que los cambios de resistencia son dependientes de la temperatura- Su nombre deriva de las palabras “térmico” y “resistor”.

termopar: Aparato que genera un voltaje (efecto Seebeck) cuando los 2 extremos de un alambre están a temperaturas diferentes.

ultrafiltrado: Solución que ha pasado a través de una membrana semipermeable.

Normalmente sólo contiene solutos de bajo peso molecular.

Propiedades Coligativas

ósmosis

El fenómeno de ósmosis no es simplemente la mezcla de 2 fluidos ni simplemente una difusión. La difusión es la mezcla de moléculas como resultado de movimientos al azar causados por energía cinética térmica (movimiento browniano). Por ejemplo, si una solución de albúmina fuera puesta cuidadosamente sobre agua, las moléculas de albúmina se moverían al azar de un lado a otro a través de la interfase. Debido a que hay más moléculas de albúmina en la solución de albúmina, hay mayor probabilidad de que una molécula de albúmina cruce la interfase hacia el lado del agua. Entonces la albúmina difundirá hacia el lado del agua hasta que la solución se haga homogénea, esto es hasta que la probabilidad de que una molécula de albúmina pueda difundir en un sentido u otro a través del límite original, debido a que la concentración en ambos lados es igual.

La palabra *ósmosis* se aplica específicamente al flujo de agua a través de una membrana semipermeable como, por ejemplo, una pared celular. Aunque la ósmosis puede ocurrir con cualquier fluido, el agua es el más importante, y en esta discusión nos referiremos a ella. Una membrana semipermeable permite que algunas partículas (moléculas, iones o agregados de moléculas) pasen a través de ella pero inhibe el pasaje de otras; por ello, el nombre de *semipermeable*. El ejemplo más simple de una membrana semipermeable es una membrana de diálisis, que normalmente es de celofán y tiene poros muy pequeños a través de los cuales pueden pasar el agua y algunas moléculas pequeñas e iones. Las moléculas grandes como las proteínas, no pueden atravesar la membrana. Como demostración, coloque una solución de albúmina en un tubo de diálisis, cierre sus extremos y colóquelo en un recipiente con agua: las moléculas de albúmina no pueden salir del tubo de diálisis atravesando la membrana, pero las moléculas de agua podrán atravesarla y afectarán la dilución de la albúmina. Como resultado, el tubo se hinchará porque el agua fluirá hacia la solución de



albúmina que está dentro del mismo, elevando la presión en el interior de la membrana. Si el tubo no se rompe por esta presión, se establecerá un equilibrio entre el agua que entra y el agua que sale por la presión interna. La presión hidrostática generada y mantenida por este proceso se denomina *presión osmótica*.

Quizás el ejemplo mas ilustrativo del proceso de ósmosis es la lisis de los glóbulos rojos por el agua: el agua fluye hacia el interior donde está el fluido intracelular (que está más concentrado) y la célula primero se hincha y luego estalla. Las células pueden también encogerse si se exponen a un fluido de osmolalidad alta. En este caso el agua sale de la célula hacia la solución concentrada que está en el exterior. En el laboratorio, la medición del volumen corpuscular medio (VCM) es afectada por este proceso. Si el diluyente no es isotónico, es decir de igual presión osmótica, las células pueden hincharse o encogerse, dando valores erróneos de volumen corpuscular medio y de hematocrito, ya que este último se calcula a partir del VCM.

Osmolalidad

El término *molaridad* es usado para caracterizar la concentración, es decir el número de moles de un soluto por litro de agua. *Molalidad* es el número de moles de soluto por Kg de agua. Debido a que un litro de agua tiene una masa de un Kg, la diferencia entre estas 2 expresiones de concentración es normalmente pequeña, siendo apreciable sólo en el caso de soluciones concentradas. En la práctica, es la diferencia entre agregar el soluto a un litro de agua (molalidad) o agregar agua al soluto para obtener un litro de solución (molaridad).

La molalidad es el término más apropiado para la osmometría porque proporciona una fórmula teórica para la presión osmótica más simple que la molaridad. El término *osmolalidad* se usa para expresar el número de moles de partículas por Kg de agua.

Debido a que la osmolalidad de una solución no depende de la clase de partículas sino solamente de su número, es denominada propiedad *coligativa*. Una solución 1 milimolal de cloruro de sodio es 2 miliosmolal ya que el cloruro de sodio se disocia en iones cloruro e iones sodio. Cada clase de ion representa una partícula que contribuye a la osmolalidad. De la misma manera, una solución 1 milimolal de cloruro de calcio es 3 miliosmolal porque cada molécula se disocia para dar 1 ion calcio y 2 iones cloruro.

Osmometría

La osmometría es la medición de la concentración, no de una molécula en particular, sino de moléculas e iones en general. En este capítulo se discuten la importancia clínica y el uso de la osmometría, se revisan las técnicas para la medición de la osmolalidad y se aportan ejemplos del instrumental usado.

Brecha osmolal

Hay unas pocas sustancias en el plasma que contribuyen significativamente a la osmolalidad, y son fundamentalmente pequeñas moléculas e iones. Por ejemplo, el plasma normalmente contiene unos 40 g de albúmina por litro, pero el número de moles de albúmina es muy pequeño (alrededor de 50 milimoles). Por el contrario, el plasma contiene alrededor de 150 milimoles de ion sodio y 100 milimoles de un anión como el cloruro. Esto corresponde a sólo 5,8 g de cloruro de sodio por litro. Entonces el cloruro de sodio contribuye unas 3000 veces más a la osmolalidad que una masa similar de albúmina.



Se han utilizado muchas fórmulas distintas para calcular la osmolalidad aproximada del suero o del plasma. La mayoría de ellas intenta combinar exactitud con simplicidad de cálculo. Una fórmula que requiera la medición de muchas sustancias no es clínicamente muy útil. La osmolalidad calculada puede ser comparada con la osmolalidad medida experimentalmente: la diferencia se denomina *brecha osmolal*. Una brecha osmolal anormal es una indicación importante de la presencia de concentraciones anormales de ciertas sustancias en la sangre. Debido a que la fórmula predice correctamente la osmolalidad del plasma, no se obtendrá nueva información en las mediciones *de rutina* de la osmolalidad. Por el contrario, en ciertas situaciones especiales que se describirán en la próxima sección, esta medición aportará información valiosa y útil.

Las fórmulas siguientes para el cálculo de la osmolalidad del suero son aproximaciones, ya que sólo incluyen los solutos que contribuyen más significativamente a la osmolalidad:

Unidades clásicas (históricas)

$$\text{Osmolalidad calculada (mOsm/Kg)} = 2 \cdot \text{Na}^+ (\text{mEq/L}) + \frac{\text{Glucosa (mg/dL)}}{18} + \frac{\text{BUN (mg/dL)}}{2,8} \quad \text{Ec. 14-1}$$

Unidades SI (Sistema Internacional de Unidades, o simplemente unidades "métricas")

$$\text{Osmolalidad calculada (mOsm/Kg)} = 2 \cdot \text{Na}^+ (\text{mmol/L}) + \text{Glucosa (mmol/L)} + \text{BUN (mmol/L)} \quad \text{Ec. 14-2}$$

La fórmula con unidades SI es muy sencilla. El factor 2 en ambas ecuaciones da cuenta del catión (sodio) y del anión correspondiente. La glucosa y la urea son moléculas no disociadas y por lo tanto se cuentan sólo una vez. Todos los otros componentes se ignoran. En la fórmula con unidades clásicas los factores divisores representan los pesos moleculares respectivos y la conversión de decilitros a litros. La osmolalidad calculada no está corregida por el contenido real de agua del plasma (los lípidos y las proteínas ocupan parte del volumen), ya que esta corrección no mejora la utilidad clínica de la brecha osmolal o de la osmolalidad en general.

Debe señalarse que estas fórmulas usan molaridad en lugar de molalidad. Esta aproximación compensa algunos componentes del suero y correcciones teóricas que se ignoran en la fórmula.

La brecha osmolal se define como:

$$\text{Brecha osmolal, Osm/Kg} = \text{Osm/Kg medida} - \text{Osm/Kg calculada} \quad \text{Ec. 14-3}$$

La brecha osmolal promedio es prácticamente cero.

Uso Clínico de la Osmometría

Hay varios usos clínicos de la osmometría. La osmolalidad del suero puede ser usada



para investigar la ingestión de sustancias tóxicas y para monitorear la terapia con manitol. Además, la medición de la osmolalidad de la orina es usada para evaluar la capacidad concentradora del riñón. La medición de la osmolalidad de las heces puede ser útil para diferenciar varias causas de deposiciones diarreicas.

Osmolalidad del plasma

Tamizaje en la ingestión de toxinas.

Solamente unas pocas sustancias exógenas pueden ser ingeridas en cantidades suficientes como para afectar la osmolalidad del plasma. La Tabla 14-1 muestra estas sustancias y las concentraciones necesarias para elevar la brecha osmolal a 10 ó más miliosmoles por Kg. Las sustancias más comunes son los alcoholes. Si la concentración de etanol medida (en mmol/L) no corresponde a la brecha osmolal calculada en menos de 10 mOsm, la brecha osmolal es excesiva, lo que sugeriría la presencia de alguna otra de las sustancias enumeradas en la Tabla 14-1. Cuando se calcula la brecha osmolal, debe confiarse en que se han minimizado los errores metodológicos y de cálculo.[ref\(296\)](#) La Tabla 14-1 muestra que el tricloroetano puede estar presente en la sangre en niveles casi letales y no ser prácticamente detectado por osmometría.

Aunque desde hace mucho tiempo la osmometría ha sido recomendada como una técnica para detectar alcohol, debe tenerse en cuenta que los osmómetros de presión de vapor no son útiles porque el alcohol disuelto es también volátil y entonces contribuye a la presión de vapor de la solución.

Un incremento en la brecha osmolal también reflejará un incremento en la brecha aniónica en pacientes con desequilibrio metabólico. Estos cambios son causados por la presencia de cuerpos cetónicos (ver Capítulo 32).

Investigación de la toxicidad por manitol.

El manitol es usado a menudo como un diurético osmótico para tratar casos de edema, especialmente edema cerebral, debido a que reduce la cantidad de agua intracelular. Aunque el manitol es una sustancia relativamente no tóxica, puede causar daño renal a niveles superiores a 50 mmol/L. La medición de la brecha osmolal en pacientes bajo terapia con manitol puede ser útil para estimar los niveles séricos de manitol. Si la brecha osmolal está entre 10 y 50 mOsm/L, es probable que el manitol se encuentre en un nivel terapéutico y no tóxico.

Osmolalidad de la orina

La capacidad concentradora es una medida sensible de la función renal. La orina que llega a la vejiga es normalmente de 1 a 3 veces más concentrada que el plasma. Una muestra de orina tomada al azar es suficiente para demostrar la capacidad del riñón para concentrar la orina si la osmolalidad de esa muestra es mayor de 600 mOsm/Kg. Sin embargo, si el resultado es menor de 600 mOsm/Kg no puede extraerse ninguna conclusión acerca de la capacidad concentradora del riñón. Una prueba definitiva puede lograrse mediante la restricción de la ingesta de agua durante la noche anterior. Después de la primera micción, por lo menos una muestra de orina debe tener una osmolalidad mayor de 800 mOsm/Kg. Los pacientes que beben agua compulsivamente necesitan de una observación continua para asegurar que no han bebido.

El peso específico estimado mediante el índice de refracción, puede también ser usado

para medir la concentración de la orina. Sin embargo, la osmometría es afectada en menor medida por la presencia de proteínas o de colorantes de contraste radiológico.

Osmolalidad de las heces

La medición de la osmolalidad de las heces diarreicas puede ser usada para diagnosticar la causa de las diarreas crónicas. Las diarreas pueden ser causadas por mala digestión de alimentos; los nutrientes no digeridos causan diuresis osmótica en los intestinos, produciendo heces con alta osmolalidad (ver Capítulo 30). Las heces acuosas también pueden ser el resultado de excreción intestinal excesiva de fluidos y electrolitos, lo que produce heces con una osmolalidad baja.

Estos dos tipos de trastornos diarreicos crónicos pueden a menudo ser diferenciados por el cálculo de la brecha osmolal fecal. La brecha osmolal fecal es la diferencia entre la osmolalidad fecal medida y el doble de la suma del sodio y el potasio fecales medidos.

$$\text{Brecha osmolal fecal} = \text{Osmolalidad medida heces} - 2 ([\text{Na}^+] + [\text{K}^+]) \text{ heces}$$

Si la brecha osmolal fecal es menor de 50 mOsm/L es muy posible que el paciente tenga diarrea secrecional.[ref\(297\)](#) Una brecha osmolal fecal mayor de 50 mOsm/L sugiere la presencia de materiales osmóticos no absorbidos como los alimentos. Una gran brecha osmolal también es característica del uso excesivo de laxantes, algunos de los cuales, como los que contienen magnesio, pueden ser detectados en las heces mediante la determinación de magnesio.

La osmolalidad de las heces líquidas frescas es aproximadamente igual a la del suero. Las heces acuosas hipoosmolales (menos de 280 mOsm/L) sugieren una diarrea ficticia, o sea aquella creada por el paciente agregando agua a sus heces, por ejemplo (síndrome de Munchausen).[ref\(298\)](#)

Las bacterias intestinales presentes en las heces pueden convertir rápidamente los carbohidratos en fragmentos osmóticamente activos, elevando la osmolalidad de las heces acuosas. Las mediciones de la osmolalidad deben ser realizadas dentro de los 30 minutos de la recolección de la muestra.

Osmolalidad sérica o plasmática

La técnica de recolección es importante para obtener una muestra válida para la medición de la osmolalidad. Por ejemplo, la estasis durante la flebotomía debe ser evitada. Además, la posición del paciente, supina o vertical, afectará la osmolalidad medida. Entonces, una muestra de un paciente hospitalizado en ayunas proporcionará los resultados más uniformes, no porque se hayan evitado la lipemia u otros factores, sino porque es más probable que el paciente esté acostado en el momento de la ronda matinal de flebotomía.

El suero y el plasma heparinizado tienen valores similares de osmolalidad. La contribución del fibrinógeno a la osmolalidad del plasma es pequeña, siendo sólo importante en la medición de la presión osmótica coloidal. Las técnicas para medir el descenso del punto de congelación pueden usar sangre entera y no son afectadas por la lipemia o por la hemólisis. Los anticoagulantes diferentes de la heparina elevan la osmolalidad medida. La Tabla 14-2 muestra el efecto estimado de 4 anticoagulantes. A veces se puede verificar la clase de anticoagulante utilizado midiendo la osmolalidad del plasma.

Principios de la Medición

La osmolalidad es una propiedad coligativa, entonces cualquiera de las cuatro mediciones que dependen de las propiedades coligativas puede ser usada para medir la osmolalidad. Las mediciones son:

- 1) Presión osmótica
- 2) Ascenso del punto de ebullición
- 3) Descenso del punto de congelación
- 4) Descenso de la presión de vapor

La medición de la presión osmótica ha sólo sido usada en una forma especial de osmometría llamada “presión osmótica coloidal”, y será discutida separadamente en una sección posterior de este capítulo. El ascenso del punto de ebullición no es útil para muestras clínicas ya que las proteínas coagularán, causando grandes cambios en la composición de la muestra. De las dos propiedades restantes, el descenso del punto de congelación es la técnica más frecuentemente usada. El descenso de la presión de vapor medido por el punto de rocío es usado más comúnmente en laboratorios pediátricos.

Abatimiento del punto de congelación

El uso de sal para fundir el hielo y la nieve es una práctica conocida. Esto es un ejemplo de abatimiento del punto de congelación: la sal disuelta incrementa la osmolalidad, y así disminuye el punto de congelación en comparación con el del solvente puro (hielo o nieve). La temperatura a la que el hielo y el agua líquida están en equilibrio es una función de la concentración de la sal. Más precisamente, la temperatura del equilibrio es una función del número de partículas en solución. La temperatura del punto de congelación disminuye 1.86 grados centígrados por cada mol de partículas disuelto por Kg de agua. Debido a que la osmolalidad de la sangre es de alrededor de 0.285 Osm/Kg (285 mOsm/Kg), el punto de congelación es de -0.53°C . La medición precisa de esta temperatura requiere un termómetro sensible. Un termistor (resistor térmico) está hecho de una mezcla de óxidos de metales de transición como manganeso, cobalto, y níquel. Estos materiales son semiconductores, y el número de electrones en la banda de conducción (electrones de valencia en la trama metálica capaces de conducir corriente) depende de la temperatura, de manera que se hacen mejores conductores cuando la temperatura aumenta. La conductancia o resistencia de los metales puede ser relacionada a la temperatura, y por lo tanto a la osmolalidad.

El descenso del punto de congelación se mide de la manera siguiente:

1. La muestra es enfriada en un baño que contiene una solución anticongelante mantenida alrededor de -5°C por un refrigerador convencional o por un enfriador termoeléctrico.
2. La muestra es sobreenfriada, es decir que su temperatura es disminuída por debajo del punto de congelación de equilibrio. Esto ocurre porque los cristales de hielo puro se forman lentamente.
3. Se induce el proceso de cristalización mediante una agitación vigorosa. Una vez que se comienzan a formar los cristales de hielo, rápidamente se les comienzan a agregar moléculas de agua. Sin embargo, en el proceso de congelación se libera calor a la vez que es absorbido en el proceso de fusión. El calor que se libera



durante la formación de los cristales de hielo eleva la temperatura de la muestra hasta que se detiene el congelamiento rápido y se establece un equilibrio térmico.

4. Se mide la temperatura en la zona en que ésta es constante, es decir, a la temperatura a la que el calor eliminado por el baño de enfriamiento es equivalente al calor liberado por el proceso de congelación. La temperatura en este equilibrio es el punto de congelación de la solución y es inversamente proporcional a la osmolalidad. La temperatura en la parte de la curva que es constante se mide electrónicamente mediante un termistor, y la temperatura leída se convierte en miliosmoles por Kg. En este momento, antes de la congelación completa que podría causar daño mecánico a la sonda del termistor, éste se saca de la muestra.

Debido a que 1 Osmol de soluto disminuye 1,86 °C el punto de congelación, la osmolalidad puede calcularse directamente con la fórmula siguiente:

$$\text{Osmolalidad (mOsm/Kg)} = \frac{\text{Descenso del punto de congelación}}{1.86 \text{ }^{\circ}\text{C}} * \text{mOsm/Kg}$$

Ec. 14-4

Sin embargo, resulta más práctico calibrar el osmómetro usando soluciones salinas. Esta calibración además corrige errores sistemáticos o de procedimiento, como el incremento en la concentración de la muestra por la eliminación de agua pura (como hielo) antes de la medición de la temperatura.

Para lograr precisión en la medida del descenso del punto de congelación deben tenerse en cuenta varios factores como la temperatura del baño y la cantidad y composición del fluido. La composición y volumen del fluido cambian a medida que se condensa la humedad del ambiente. El espesor de la cámara para la muestra y la cantidad de muestra deben ser estandarizados. La sonda debe ser lavada y escurrida para minimizar la contaminación de una muestra con la siguiente. Esto es especialmente importante entre muestras de osmolalidad muy diferente, como los estándares y las muestras de orina. Las muestras pueden medirse de nuevo, pero debe ponerse gran cuidado al calentarlas (por ejemplo manteniendo el recipiente para la muestra en la mano) hasta que *todo* el hielo se funda; de otra manera se obtendrá un punto de fusión menor que el real. Las gotas de muestra en las paredes del recipiente deben ser incorporadas a la misma moviendo dicho recipiente.

La Tabla 14-3 muestra los osmómetros de punto de congelación más comunes y sus características más importantes.

Descenso de la presión de vapor

Las moléculas de solvente de la superficie de un líquido están en movimiento térmico continuo; algunas de estas moléculas escapan de la superficie a la atmósfera, formando una fase gaseosa de vapor en equilibrio con la fase líquida. Este proceso es llamado evaporación. Si el líquido contiene un soluto disuelto, algunas moléculas de este soluto no se evaporarán pero evitarán que se evaporen algunas moléculas de solvente. A medida que aumenta el número de moléculas de soluto, disminuye la probabilidad de que una molécula de solvente se evapore, reduciendo la fase de vapor por encima del líquido. Entonces hay una relación inversa entre la concentración de partículas de soluto disueltas (osmolalidad) y la presión de vapor de una solución. En la osmometría por medida de la presión de vapor, se compara el

descenso de la presión de vapor de una solución de osmolalidad desconocida con el de una solución estándar.

La temperatura a la que la atmósfera está saturada con el solvente puede ser medida con un termopar. Un termopar genera un voltaje (efecto Seebeck) entre los extremos de un alambre. La diferencia de voltaje entre dichos extremos depende de la diferencia de temperatura.

Los termopares también exhiben el efecto Peltier, que es opuesto al efecto Seebeck. Una corriente eléctrica que pasa a través de un termopar transfiere calor de un extremo a otro. Un extremo se enfría y el otro se calienta. En el osmómetro de presión de vapor pasa una corriente eléctrica a través de un termopar en la cámara de medición, provocando su enfriamiento. Cuando su temperatura disminuye lo suficiente, comienza a condensarse agua (solvente) sobre ella. La corriente eléctrica se interrumpe y el termopar llega a una temperatura de equilibrio, en la cual el agua que condensa sobre ella corresponde al agua que se evapora de la misma. Esta temperatura de equilibrio se mide por el voltaje Seebeck, que está relacionado en forma lineal a la osmolalidad.

El descenso de la presión de vapor se mide de la manera siguiente:

1. La muestra se coloca en la cámara y ésta se cierra herméticamente. La humedad del aire en contacto con la muestra cambia rápidamente hasta que se llega a un equilibrio.
2. El termopar se enfría hasta que su temperatura quede por debajo del punto de rocío. Se interrumpe la corriente eléctrica y la temperatura del termopar se eleva a medida que se condensa vapor sobre él.
3. Se mide la temperatura en el intervalo que ésta es constante (temperatura a la que existe un equilibrio entre condensación y evaporación).

La presión de vapor de una muestra es directamente proporcional al voltaje del termopar. Nuevamente, es más importante calibrar este tipo de instrumentos que aplicar factores teóricos. Los errores sistemáticos o de procedimiento que deben ser controlados son el volumen de muestra, el tamaño y composición del disco absorbente de la muestra, el tiempo que transcurre entre la aplicación de la muestra y el sellado de la cámara, la limpieza de la cámara, y los cambios en la temperatura ambiente.

La Tabla 14-3 provee información sobre el único osmómetro clínico de presión de vapor disponible.

Presión Osmótica Coloidal

Definiciones

La presión osmótica es una propiedad coligativa y por lo tanto refleja la osmolalidad. Esto es estrictamente cierto para una membrana semipermeable que solamente es permeable al agua. La dificultad en obtener dicha membrana ha impedido que la medición de la presión osmótica sea usada para evaluar la osmolalidad de muestras clínicas. Sin embargo, resulta práctico y útil medir la contribución osmolal de un grupo de moléculas responsable de la presión osmótica coloidal (POC). Esta propiedad se mide usando membranas permeables a moléculas pequeñas. Estas moléculas, de peso molecular menor de 30,000 daltones, son denominadas *cristaloides* si no están cargadas e *iones* si lo están. Las moléculas de mayor peso molecular son llamadas



coloides. Por lo tanto, la presión osmótica coloidal mide solamente la contribución a la osmolalidad de las moléculas grandes, esencialmente proteínas. Un término alternativo es el de presión *oncótica*.

Uso clínico de la presión osmótica coloidal

El uso principal de la medición de la POC es la detección de condiciones que llevan al edema pulmonar. En esta condición, se acumula agua en los pulmones, lo que interfiere con el intercambio de oxígeno y anhídrido carbónico. El diagnóstico real puede ser obtenido mediante rayos x. Para predecir el edema pulmonar son necesarias dos mediciones: presión del ventrículo cardíaco izquierdo y POC. Cuando la POC es mayor que la presión sanguínea pulmonar (medida por la presión de una porción de la arteria pulmonar) es poco probable que exista edema pulmonar. Si no hay falla cardíaca, es decir si la presión sanguínea pulmonar es normal, las mediciones de POC por sí solas permiten predecir la probabilidad de edema pulmonar.

El conocimiento del contenido plasmático de albúmina o proteínas totales permite el cálculo de la POC. Sin embargo, la fórmula no es exacta cuando se usa para pacientes con enfermedades agudas (especialmente aquellos con falla cardíaca) y para pacientes que han recibido dextranos o expansores plasmáticos. Para estos grupos de pacientes, la medición de la POC es muy útil.

Medición de la presión osmótica coloidal

La POC se mide con un filtro microporoso o membrana que contiene poros o canales de diámetros cuidadosamente controlados para que sea impermeable a moléculas grandes (proteínas). Se coloca solución fisiológica en una cámara hermética de un lado de la membrana y la muestra del otro lado. La solución fisiológica fluye hacia la muestra hasta que la contrapresión detiene el flujo. Esta contrapresión o presión negativa se mide mediante un manómetro. Además de la presión osmótica, el efecto Donnan crea una presión adicional. Este efecto es provocado porque a pH fisiológico la mayoría de las proteínas están cargadas negativamente. Debido a que la muestra es eléctricamente neutra, en las proteínas hay igual número de cargas positivas que de negativas. Estas cargas positivas están principalmente en forma de iones sodio. Los iones sodio difunden a través de la membrana mientras que las proteínas cargadas negativamente no pueden hacerlo, lo que lleva a una separación de cargas eléctricas. Debido a esta separación de cargas, las moléculas pequeñas cargadas negativamente son atraídas a través de la membrana. Como resultado, el número de partículas que difunden será mayor que el que resulta de la ósmosis simple, y la presión a través de la membrana será mayor. Como la carga neta de las proteínas cambia con el pH, la POC medida cambiará también con el pH.

La POC es expresada habitualmente en milímetros de mercurio (mm Hg). En la práctica, la presión máxima se obtiene entre 30 y 90 segundos después de colocar la muestra en el instrumento. Se elige este valor porque la presión disminuye con el tiempo como resultado de imperfecciones en la membrana que permiten difundir a las moléculas grandes hacia el lado de la solución fisiológica, reduciendo la presión verdadera. Las características de un osmómetro coloidal disponible comercialmente se enumeran en la Tabla 14-3.

Bibliografía



Dorman HR, Sondheimer JH, Cadnapaphornchai P: Mannitol-induced acute renal failure, *Medicine* 69:153-159, 1990.

Dorwart VW, Chalmers L: Comparison of methods for calculating serum osmolality from chemical concentrations and the prognostic value of such calculations, *Clin Chem* 21:190-194, 1975.

Epstein FB: Osmolality, *Emerg Med Clin North Am* 4:253-261, 1986.

Eskew L, Speicher CE: Using anion and osmolar gaps to diagnose the cause of intoxicification, *Diagn Med*, p 6, Feb 1985.

Geheb MA: Clinical approach to the hyperosmolar patient, *Crit Care Clin* 3:797-815, 1987.

Referencias

1. Demedts P, Theunis L, Wauters A, et al: Excess serum osmolality gap after ingestion of methanol: a methodology associated phenomenon? *Clin Chem* 40:1587-1590, 1994.
2. Binder HJ: The gastroenterologist's osmotic gap: fact or fiction? *Gastroenterology* 103:702-704, 1992.
3. Topazian M, Binder HJ: Brief report: factitious diarrhea detected by measurement of stool osmolality, *N Engl J Med* 330:1418-1419, 1994.

Tablas

Tabla 14-1. Sustancias tóxicas que afectan la osmolalidad del plasma.

Sustancia	<u>Concentraciones tóxicas o letales</u>		Incremento en osmolalidad (mOsm/Kg)
	Unidades clásicas (mg/dL)	Unidades SI (mmol/L)	
Etanol	350	80	80
Isopropanol	340	60	60
Metanol	80	24	24
Eter etílico	180	24	24
Tricloroetano	100	9	9
Acetona	55	10	10
(incluyendo otras cetonas o meta-bolitos cetónicos)			

Tabla 14-2. Efecto estimado de los anticoagulantes sobre la osmolalidad (en comparación con el suero).

Anticoagulante	Tubo lleno (mOsm/Kg)	Medio tubo (mOsm/Kg)
Heparina	+ 0	+ 0
EDTA (sal disódica)	+15	+ 30
Fluoruro-oxalato (fluoruro de sodio-oxalato de potasio) *	+ 150	+ 300



Acido yodoacético (sal de litio)	+ 5	+ 10
*Este estado hiperosmolal da cuenta de la hemólisis observada frecuentemente en el plasma de estas muestras.		

Tabla 14-3. Características de los osmómetros clínicos.

Proveedor Tiempo de medida (seg)	Modelo*	Técnica [∇]	Volumen de muestra (μL)	Precisión (%) [∞]
Advanced Instruments, Inc. 120-180 (Needham Heights, Mass.)	3D3	PF	200	1,4
Fiske Associates, Inc. (Needham Heights, Mass.)	3MOPlus One-Ten	PF [■]	20 15	60 1,6 60
Precisión Systems, Inc. (Natick, Mass.)	5002 μOsmette	PF PF [■]	200 50	1,6 180
Wescor, Inc. 60-90 (Logan, Utah)	5500 4420	PV POC	10 450	2,8 6,7
* En todos los modelos la carga de muestra es manual y la medición y reporte de resultados automáticos. [∇] PF, descenso del punto de congelación; PV, presión de vapor; POC, presión osmótica coloidal. [∞] Valores obtenidos de un estudio del Colegio Americano de Patólogos. (CAP) [■] Usa enfriamiento electrónico en lugar de baño refrigerante líquido.				

CAPÍTULO 15

15. Electroquímica: Principios y Mediciones

Jon R. Kirchhoff

John F. Wheeler

Craig E. Lunte

Sarah H. Jenkins

William R. Heineman

Métodos potenciométricos

Electrodos de referencia

Electrodos indicadores



Precauciones y metodología

Condiciones experimentales e interferencias

Métodos voltimétricos

Electrodos voltimétricos

Electrodo de oxígeno

Electrodo de glucosa

Cromatografía de líquidos con detección electroquímica

Voltimetría de remoción anódica

Métodos coulométricos

Titulación de cloruro

OBJETIVOS

- Comprender las diferencias fundamentales entre técnicas potenciométricas y voltimétricas y entender como cada técnica es utilizada en mediciones clínicas.
- Comprender los procesos por medio de los cuales los electrodos selectivos de iones responden a la presencia de un compuesto analizado.
- Promover un conocimiento de la metodología y las posibles interferencias asociadas con el uso de la electroquímica en el laboratorio clínico.
- Entender cómo varias técnicas voltimétricas y coulométricas son utilizadas en determinaciones clínicas.

Términos clave

actividad La concentración efectiva de las especies de una solución que interactúan con las especies de otra solución.

amperimetría Técnica de potencial controlado en la cual la corriente es medida a un potencial aplicado fijo.

ánodo El electrodo (positivo) en el cual ocurre la oxidación.

carga Cantidad de electricidad que refleja la corriente total durante un tiempo dado: $Q = it$.

cátodo El electrodo (negativo) en el cual ocurre la reducción

coeficiente de actividad Concentración efectiva (actividad) dividida entre la concentración molar. Una medida del grado con el que una especie interactúa con las especies de otra solución.

conductividad Una medida de la capacidad relativa de los materiales para transportar una corriente eléctrica

corriente La velocidad de flujo de carga (1 ampere = 1 coulomb/segundo)

corriente limitante La porción de un voltigrama hidrodinámico donde se lleva a cabo la electrólisis y la corriente permanece constante como una función del aumento de potencial aplicado

coulometría Técnica en la cual es medida la carga requerida para producir la electrólisis completa de una muestra

ecuación de Nernst La expresión que relaciona el potencial de celda con el potencial de celda estándar y las actividades de los reactivos y productos en la celda electroquímica

electrodo auxiliar El electrodo en la celda electroquímica de tres electrodos que lleva la



corriente para mantener la electrólisis en el electrodo de trabajo.

electrodo de referencia Electrodo con un potencial de media celda estable que es utilizado para medir y controlar el potencial relativo del electrodo de trabajo

electrodo indicador Electrodo cuyo potencial varía en la medida en que la concentración de reactivos o productos cambia en la solución. Este potencial está gobernado por la ecuación de Nernst

electrodo selectivo de iones Electrodo indicador utilizado en potenciometría para responder a iones específicos en solución

electrólisis Reacción electroquímica no espontánea producida mediante la aplicación de potencial a una celda electroquímica

estado estándar La condición en la cual cada especie está presente con actividad unitaria

fuerza iónica (μ) La mitad de la suma de la concentración (C_i) multiplicada por el cuadrado de la carga (Z_i) por cada una de las especies iónicas en solución: $\mu = 1/2 \sum C_i Z_i^2$

ionóforo Molécula acarreadora neutra incorporada a un electrodo selectivo de iones para detectar un ion específico

oxidación El proceso en el cual una especie química pierde uno o más electrones

polarigrafía Voltimetría que se lleva a cabo en un electrodo de trabajo de mercurio descendente

potencial de celda Medida cuantitativa de la energía en una celda electroquímica; la diferencia de energía electrónica entre los dos electrodos

potencial de celda estándar Potencial electroquímico de la celda medido bajo condiciones estándar

potencial de media celda Medida cuantitativa de la energía de una reacción de media celda respecto al electrodo de referencia

potencial de unión líquida Potencial que se desarrolla en la interfase entre dos soluciones no idénticas

potencióstato Instrumento designado para el control del potencial en una celda electroquímica

potenciometría Técnica en la cual la diferencia de potencial entre dos electrodos se mide bajo condiciones de equilibrio

punto salino Instrumento que permite el movimiento iónico entre los compartimentos de una celda electroquímica para mantener el contacto eléctrico y al mismo tiempo evitar la mezcla de las soluciones separadas

reacción de media celda Reacción electroquímica que representa ya sea una oxidación o una reducción en uno de los electrodos de una celda electroquímica

reducción Proceso en el cual las especies químicas ganan uno o más electrones

solución electrolítica Solución de iones que provee de un medio conductor para un proceso electroquímico

voltigrama hidrodinámico Representación gráfica de la corriente contra el potencial aplicado para una reacción electroquímica particular que ocurre en una solución en condiciones de agitación o flujo

voltimetría Técnica donde la corriente es medida como una función del potencial aplicado.

voltimetría de remoción Técnica voltimétrica que permite la preconcentración de la muestra en el electrodo antes del análisis voltimétrico

La *electroquímica* involucra la medición de las señales eléctricas asociadas con los sistemas químicos que están incorporados dentro de una celda electroquímica. La celda consiste en dos o más electrodos que sirven como interfase entre un sistema químico y otro eléctrico. El sistema eléctrico mide o controla los parámetros eléctricos de voltaje y corriente, los cuales son característicos de un sistema químico particular.

La *electroquímica analítica* hace uso de la electroquímica para realizar los análisis. En la aplicación de esta técnica, la magnitud de la señal de voltaje o corriente originada en una celda electroquímica está relacionada con la actividad o concentración de una especie química particular en la celda. Muchas técnicas de análisis electroquímico muestran excelentes límites de detección acoplados a un rango amplio y dinámico, con rangos de operación entre 10^{-8} a 10^{-3} M. Las mediciones se pueden realizar generalmente en volúmenes muy pequeños de muestra, esto es, en el rango de microlitros. La combinación de bajos límites de detección y volúmenes de muestras de microlitros permite en algunas circunstancias, medir rutinariamente cantidades picomolares del compuesto analizado. Además, el electroanálisis puede ser empleado para mediciones in vivo. Por ejemplo, los sensores electroquímicos en miniatura son utilizados para medir pH y pO_2 en el torrente sanguíneo de pacientes con catéteres internos.

En el laboratorio clínico, el análisis electroquímico es utilizado rutinariamente para la determinación de diversos iones, drogas, hormonas, metales, y gases. Existen métodos para la determinación rápida de compuestos presentes a concentraciones relativamente elevadas, tales como los electrolitos sanguíneos (Na^+ , Cl^- , HCO_3^-) y sustancias presentes a muy bajas concentraciones, como los metales pesados y los metabolitos de drogas en muestras de sangre y orina.

El propósito de este capítulo es proveer un marco que abarque los fundamentos para comprender las técnicas electroquímicas utilizadas en el laboratorio clínico e ilustrar algunas de las aplicaciones prácticas del análisis electroquímico. Estas técnicas electroquímicas fundamentales se dividen en tres categorías básicas: potenciométricas, voltimétricas y coulométricas. Las aplicaciones clínicas de la electroquímica más ampliamente difundidas son las potenciométricas e involucra la medición del potencial de una celda bajo condiciones de equilibrio. La voltimetría y coulometría son consideradas técnicas dinámicas y están basadas en mediciones hechas en una celda en la cual se está llevando a cabo la electrólisis. En la Tabla 15-1 se enumeran varias definiciones comunes, símbolos, y nomenclatura electroquímica utilizada en potenciometría, voltimetría y coulometría.

Métodos Potenciométricos

Los métodos potenciométricos están basados en la medición de la diferencia de potencial (voltaje) entre dos electrodos inmersos en una solución en ausencia de flujo de corriente. Los electrodos y la solución constituyen una *celda electroquímica*. Cada electrodo en la celda electroquímica está caracterizado por una *reacción de media celda* con el correspondiente *potencial de media celda*. Debido a que no pasa corriente a través de la celda mientras es medido el potencial, no se está llevando a cabo una reacción electroquímica neta; por lo que una técnica potenciométrica es un método de equilibrio. Las técnicas potenciométricas son importantes porque proveen de mediciones exactas de las actividades, concentraciones, o



coeficientes de actividad de muchas especies en solución. En general, una solución de iones o moléculas está caracterizada por su concentración molar. Sin embargo, estas especies pueden interactuar con otros iones, moléculas, o solvente. Dependiendo del tipo de interacciones que ocurran, la *concentración efectiva* de las especies puede ser menor, mayor, o igual a la concentración molar real de las especies. La concentración efectiva se conoce como la *actividad* de las especies y se relaciona con la concentración molar mediante un coeficiente de actividad el cual se muestra en la ecuación

$$a_i = \gamma_i C_i,$$

donde a_i es la actividad de una especie iónica, γ_i es el coeficiente de actividad, y C_i es la concentración molar de esas especies.

Un aparato típico en la potenciometría es mostrado en la Fig. 15-1. La diferencia de potencial entre los dos electrodos se mide generalmente por un milivoltímetro de pH. Un electrodo, el *electrodo indicador*, es seleccionado de tal forma que el potencial de media celda corresponda a los cambios en la actividad o concentración de una determinada especie en la solución a medir. El otro electrodo es un *electrodo de referencia* cuyo potencial de media celda no cambia. Es importante entender que *no* se mide un potencial de media celda individual, sino únicamente la *diferencia* de potencial entre una media celda y el electrodo de referencia. Los electrodos de referencia más comúnmente utilizados para potenciometría son el electrodo saturado de calomel y el de plata/cloruro de plata. El potencial de la celda electroquímica potenciométrica, E_{celda} , está dado por:

$$E_{celda} = E_{ind} - E_{ref} + E_{ul} \quad \text{Ec. 15-1}$$

donde E_{ind} es el potencial de media celda del electrodo indicador, E_{ref} es el potencial de media celda del electrodo de referencia, y E_{ul} es el *potencial de unión líquida*. El potencial de unión líquida es el potencial eléctrico que se desarrolla en la interfase entre dos líquidos como resultado de las diferencias en las velocidades con las que se mueven los iones de un líquido a otro. Por ejemplo, en la Fig. 15-1 el potencial de unión líquida se alcanza cuando la punta del electrodo de referencia entra en contacto con la solución. Por consiguiente, E_{ul} es el potencial que resulta de las diferencias de carga más que de una reacción electroquímica en un electrodo.

Electrodos de referencia

Debido a que cualquier medición electroquímica debe ser realizada con respecto a un potencial de referencia, se requiere de una discusión más amplia con respecto a las propiedades y tipos de electrodos de referencia. Un electrodo de referencia es una media celda electroquímica que es utilizada como referencia fija para la medición de potenciales de celda. Idealmente, un electrodo de referencia debería poseer las siguientes características: un potencial de media celda estable y fácilmente reproducible; una reacción de media celda reversible; estabilidad química de sus componentes, y facilidad en su fabricación y uso. Enseguida se discuten tres electrodos de referencia; uno de ellos es de relevancia fundamental y otros dos son de importancia práctica.



El *electrodo estándar de hidrógeno (EEH)* ha sido seleccionado como el electrodo de media celda de referencia en que se basan las tablas de potenciales de electrodos estándar. En esta media celda, se burbujea hidrógeno gaseoso a una presión de una atmósfera sobre un electrodo de platino inmerso en una solución ácida, cuya actividad de H^+ es unitaria. El potencial del EEH está definido como 0.0V a todas las temperaturas, y los potenciales de las otras medias celdas acopladas están referidas a este valor. Los potenciales de las otras medias celdas son positivas o negativas. Debido a que otros electrodos de referencia son más fáciles de construir y usar, rara vez se utiliza el EEH en aplicaciones prácticas de electroquímica.

Un electrodo de referencia utilizado comúnmente es el *electrodo saturado de calomel (ESC)*. En la Fig. 15-2, A se muestra un esquema de un tipo común de ESC, su reacción de media celda, y su potencial de media celda. El electrodo consiste de mercurio elemental cubierto con una capa de calomel (Hg_2Cl_2) que está en contacto con una solución acuosa saturada con KCl. El potencial de media celda deberá ser constante en tanto la actividad del Cl^- no cambie. La manera más simple de mantener la actividad de Cl^- a un valor fijo y fácil de verificar, es saturar la solución con una sal de cloro como el KCl. Mientras los cristales de KCl estén presentes, el experimentador sabe que la solución está saturada y que la actividad de Cl^- es constante. Es importante señalar que los otros componentes de la reacción electroquímica (Hg_2Cl_2 y Hg) son sólidos o líquidos y consecuentemente exhiben una actividad unitaria independientemente de las cantidades presentes en la celda. De esta forma, el ESC ofrece la conveniencia extraordinaria de ser fabricado fácilmente sin la necesidad de una preparación exacta de las actividades de cualquiera de los componentes.

Otro electrodo de referencia utilizado comúnmente es el *electrodo de plata/cloruro de plata (Ag/AgCl)*. En la Fig. 15-2, B se muestra una representación del electrodo Ag/AgCl. El electrodo se prepara mediante el recubrimiento de un alambre de plata con una capa delgada de AgCl, que se sumerge en una solución de concentración constante de cloro, la cual fija el potencial de la media celda. El electrodo de referencia Ag/AgCl es utilizado rutinariamente, especialmente como electrodo de referencia interno en los electrodos potenciométricos de membrana. El ESC y el de Ag/AgCl están disponibles comercialmente o se pueden construir con las especificaciones requeridas.

Electrodos indicadores

El electrodo indicador es el componente esencial del análisis potenciométrico. Este electrodo debe interactuar con el compuesto de interés de tal forma que el E_{ind} refleje la actividad de estas especies en solución y no de otros compuestos presentes en la muestra que puedan interferir. La respuesta relativa de un electrodo a una especie particular está definida por la *selectividad* del electrodo. La importancia de tener electrodos indicadores que respondan selectivamente a especies de relevancia analítica ha estimulado el desarrollo de muchos tipos de estos electrodos.

Electrodos selectivos de iones

El electrodo indicador más comúnmente utilizado en química clínica es el *electrodo selectivo de iones (ESI)*. El ESI está basado en la medida de un potencial que se desarrolla a través de una membrana selectiva. Así pues, la respuesta de la celda electroquímica está basada en una interacción entre la membrana y el compuesto analizado que altera el potencial a través de la

membrana. La selectividad de la respuesta del potencial a un compuesto depende de la especificidad de la interacción de la membrana por dicho compuesto.

En la Fig 15-3 se muestra una representación de un ESI. El electrodo consiste de una membrana, un electrolito de referencia interna de actividad fija, $(a_i)_{\text{interna}}$ y un electrodo de referencia interno. El ESI es sumergido en una muestra en solución que contiene el compuesto analizado con una determinada actividad $(a_i)_{\text{muestra}}$. Un electrodo de referencia externa también es sumergido en la solución. Los electrodos de referencia interna y externa constituyen las dos medias celdas de la celda electroquímica. El potencial medido por el medidor de pH/mV (E_{celda}) es igual a la diferencia de potencial entre los electrodos de referencia externa ($E_{\text{ref,ext}}$) e interna ($E_{\text{ref,int}}$), más el potencial de membrana (E_{memb}), más el potencial de unión líquida (E_{ul}) que existe en la unión entre el electrodo de referencia externa y la muestra en solución.

$$E_{\text{cell}} = E_{\text{ref, ext}} - E_{\text{ref, int}} + E_{\text{memb}} + E_{\text{ul}} \quad \text{Ec. 15-2}$$

Si la membrana es permeable a un ion particular, se desarrolla un potencial a través de la membrana, el cual depende de la relación entre las actividades del ion en cada lado de la membrana. Los potenciales de media celda de los dos electrodos de referencia son constantes, las condiciones pueden ser controladas de tal forma que el E_{ul} sea efectivamente constante y la composición de la solución interna pueda ser mantenida de tal manera que la $(a_i)_{\text{interna}}$ esté fija. Consecuentemente, el E_{celda} está descrito por la ecuación de Nernst:

$$E_{\text{celda}} = K + 2.3 RT/zF \log (a_i)_{\text{muestra}} \quad \text{Ec. 15.3}$$

donde K representa los términos constantes y z es la carga del ion del compuesto analizado (cationes: +1, +2, +3 y demás; aniones: -1, -2, -3 y demás). Esta relación logarítmica entre el potencial de la celda y la actividad del compuesto analizado es la base del ESI como herramienta analítica. Una gráfica del E_{celda} contra $\log a_i$ en una serie de soluciones estándar debe ser lineal a lo largo del rango de trabajo del electrodo y debe tener una pendiente de $2.3RT/zF$ ó $0.0591/z$ para mediciones hechas a 25 °C. Como las membranas responden en cierta medida a iones diferentes al compuesto analizado (es decir iones interferentes), se requiere una expresión más general de la ecuación 15-3:

$$E_{\text{celda}} = K + 2.3 RT/zF \log [(a_i)_{\text{muestra}} + k_{ij} a_j^{z/x}] \quad \text{Ec. 15-4}$$

donde a_j es la actividad del ion interferente $[j]$, x es la carga del ion interferente, y k_{ij} es la constante de selectividad. Valores pequeños de k_{ij} son característicos de los electrodos con buena selectividad para el compuesto analizado, i .

El desarrollo de ESIs exitosos ha obligado a la búsqueda de membranas que tengan tanto sensibilidad como selectividad por el compuesto de interés. De las dos propiedades, la selectividad es por mucho la más difícil de alcanzar. Se han desarrollado ESIs con selectividad para cationes u aniones con tres tipos básicos de membranas: líquida y polimérica, en estado sólido, y de vidrio. Todas estas membranas funcionan incorporando selectivamente el ion

dentro de la membrana y estableciendo por lo tanto un potencial de membrana. Una membrana de ESI debe exhibir baja solubilidad en el medio del compuesto analizado para proveer de un electrodo durable con una respuesta estable. Este requisito impone una restricción severa al material que puede ser utilizado para las membranas. También, la membrana debe mostrar alguna conductividad eléctrica para funcionar en una celda electroquímica. El alcance de los ESIs se ha expandido para incluir la medición de gases y compuestos orgánicos mediante la combinación de ESIs con membranas permeables a los gases y capas de enzimas, bacterias, y tejidos. Estas categorías generales de electrodos y ESIs específicos son consideradas en las siguientes secciones.

Electrodos membranas líquidas y poliméricas.

Una membrana selectiva de iones es la base para muchos ESIs de excelente desempeño. El líquido consiste en un solvente viscoso insoluble en agua, en el cual se disuelve un *ionóforo*, un intercambiador de iones orgánico hidrofóbico, o una molécula acarreadora neutra que reaccione selectivamente con el ion de interés. El líquido normalmente está embebido en una delgada membrana porosa sólida como el acetato de celulosa, que luego se incorpora en el ESI.

La Fig. 15-4 muestra el esquema de la porción de la membrana de un ESI de membrana líquida y el mecanismo mediante el cual el electrodo responde a la actividad de M^+ . La membrana líquida está en contacto con las soluciones acuosas interna y de la muestra del compuesto analizado M^+ . El ionóforo acarreador neutral (R) reacciona con M^+ en cada interfase de la solución y extrae M^+ hacia la membrana como MR^+ . La extracción de M^+ hacia la membrana genera un potencial positivo de membrana en cada interfase, causado por la diferencia de carga que ocurre cuando M^+ es extraído hacia la membrana en forma de MR^+ y el contraión X^- permanece en la solución acuosa. A medida que aumenta en la solución la actividad de M^+ , la actividad de MR^+ aumenta en la superficie de la membrana, y también el potencial de membrana aumenta. Esta reacción existe en ambas superficies de la membrana, la externa que está expuesta a la muestra y la interna que está en contacto con la solución de llenado del ESI. El potencial de la superficie interna de la membrana, $E_{memb(interna)}$ se mantiene constante al mantener constante la actividad de M^+ en la solución interna. Por lo tanto, el único cambio de potencial medido en el circuito es el potencial de la superficie de membrana en contacto con la muestra, $E_{memb(muestra)}$.

La disponibilidad de electrodos de membrana líquida y polimérica para una variedad de iones es el resultado del desarrollo de diferentes ionóforos acarreadores neutrales e intercambiadores de iones líquidos que reaccionan selectivamente con iones particulares. En la superficie en equilibrio mostrada en la Fig. 15-4, cualquier especie iónica diferente de M^+ que reaccione en grado considerable con R, también generará un potencial de membrana y por lo tanto provocará una interferencia. La selectividad del electrodo por M^+ está determinada consecuentemente por la afinidad relativa entre R y M^+ , así como por R y los diferentes iones interferentes presentes en la muestra. Se han descubierto algunos ionóforos que unen selectivamente cationes a membranas no acuosas. Cuando un catión reacciona con un ionóforo, esencialmente se inserta en una cavidad hidrofóbica dentro del ionóforo, lo que

permite al catión existir dentro de un medio membranar no acuoso. La selectividad por una especie catiónica en particular es controlada proporcionando un ambiente óptimo en términos de número y posición de átomos de unión. Un ejemplo excelente es el antibiótico, valinomicina, el cual muestra una fuerte selectividad por K^+ . La Fig. 15-5 ilustra el complejo de valinomicina con K^+ . El ion potasio enbota en una cavidad estrecha rodeada de átomos de oxígeno. El electrodo muestra excelente selectividad por K^+ comparando con Na^+ porque el ion sodio es más pequeño y enbota con menos precisión en la cavidad de valinomicina. Esta característica es de considerable importancia práctica en la determinación clínica de K^+ en suero, donde la concentración de Na^+ es mayor que la de K^+ . También se han incorporado a los ESI los ionóforos para la determinación selectiva de Na^+ , Li^+ y Mg^{2+} . La incorporación selectiva de estos cationes ocurre por el mismo principio del electrodo de K^+ . El desarrollo de los ESI con membrana líquida y polimérica ha permitido la medición de iones en muestras de diferente procedencia. Los electrodos han sido especialmente exitosos en los laboratorios clínicos y son utilizados actualmente en forma rutinaria para medir Ca^{2+} , K^+ , Na^+ y Cl^- en fluidos biológicos. Las características de la respuesta de los sistemas de ESI con membrana líquida y polimérica utilizados comúnmente en investigaciones biomédicas se muestran en la Tabla 15-2.

Los electrodos basados en reacciones de pares iónicos han sido desarrollados para numerosos compuestos orgánicos. Estos electrodos están basados en pares iónicos insolubles entre una forma iónica del compuesto orgánico y un reactivo del par iónico. Un ejemplo es un electrodo para el medicamento antiepiléptico fenitoína (5,5-difenilhidantoína) basado en el complejo de pares iónicos entre el anión 5,5-difenilhidantoinato y el catión de amonio cuaternario, tricaprilmetil amonio, el cual está inmovilizado en cloruro de polivinilo.

El electrodo mide fenitoína en un rango de 10^{-1} a 10^{-4} mol/L y tiene un límite de detección de 1.5×10^{-5} mol/L. Este electrodo puede ser utilizado para determinar fenitoína en tabletas o cápsulas. Continuamente se están evaluando nuevos intercambiadores de iones y acarreadores neutros en un esfuerzo para mejorar la selectividad de los electrodos existentes y para desarrollar electrodos para otros iones y moléculas.

Electrodos de membrana en estado sólido.

Las membranas en estado sólido consisten en cristales simples o pastillas compactas de sales de los iones de interés. El cristal o pastilla debe tener un grado de conductividad eléctrica y mostrar muy baja solubilidad en el solvente en el cual el electrodo se va a utilizar (generalmente agua). Un ESI excelente para F^- utiliza LaF_3 que está recubierto con Eu^{2+} para proporcionar conductividad eléctrica. El potencial de membrana es generado por una superficie de reacción selectiva entre LaF_3 y F^- en la cual el F^- en la solución se incorpora en los espacios en la red cristalina. La selectividad es muy buena porque otros iones no ajustan bien en la estructura cristalina. Las propiedades del ESI- F^- se muestran en la Tabla 15-2. Otro electrodo de membrana de estado sólido importante en la clínica para la determinación de Cl^- está basado en membranas de pastillas comprimidas del conductor iónico, Ag_2S_2 y $AgCl$. Se han desarrollado electrodos similares para la detección de Br^- , CN^- , I^- , SCN^- , S^{2-} , Ag^+ , Cu^{2+} ,



Pb^{2+} y Cd^{2+} .

Electrodos de membrana de vidrio.

El primer ESI y el más ampliamente utilizado es el electrodo de membrana de vidrio para mediciones de pH. Los vidrios de ciertas composiciones responden al pH cuando se desarrolla un potencial de membrana como resultado de un mecanismo de intercambio de iones con H^+ , el cual sucede en la delgada capa externa hidratada de una membrana de vidrio que está inmersa en una solución. Las notables propiedades del electrodo de vidrio para pH se atribuyen a la gran selectividad de su superficie de reacción por el H^+ .

El diseño básico del electrodo de vidrio para pH se muestra en la c. El electrodo consiste en un tubo de plástico o vidrio con una membrana delgada sensible al pH, que está sellada en la punta. Usualmente la membrana es de cerca de 50 μm de espesor y por lo tanto es muy frágil. La esfera al final contiene una solución interna compuesta de HCl 0.1 M en la cual se encuentra sumergido un alambre de plata cubierto con AgCl , el cual provee de un electrodo de referencia Ag/AgCl . Esta solución también mantiene un contacto eléctrico fijo entre el alambre interno de Ag y el medidor de pH externo.

La respuesta al pH de la membrana de vidrio está determinada por la composición del vidrio. El vidrio consiste de Na_2O , CaO y SiO_2 . El SiO_2 es esencialmente un aislante que no responde al pH. La adición de Na_2O a la formulación del vidrio modifica la estructura del SiO_2 de tal forma que los sitios óxido cargados negativamente se asocian con el Na^+ . La movilidad del Na^+ en el vidrio proporciona a la membrana de vidrio una ligera conductividad a la carga eléctrica. Los sitios de óxido negativos funcionan como sitios intercambiadores de iones en solución acuosa y proporcionan la base para la respuesta a pH. La respuesta potencial al pH es extraordinariamente exacta a lo largo de la escala de pH entre 0 y 14. A valores de pH entre 9 y 10, el electrodo muestra una respuesta significativa a otros cationes monovalentes tales como Na^+ y K^+ . Esta respuesta a los cationes alcalinotérreos a pH alto es denominada *error alcalino*. Éste puede ser minimizado por el reemplazo en el vidrio de Na_2O y CaO por Li_2O y BaO en determinada medida. La respuesta de la membrana a H^+ es atribuida a un proceso de intercambio iónico que ocurre en la proximidad de la interfase de la solución membranal. Durante la inmersión de una membrana seca de vidrio en una solución acuosa la superficie de la membrana se hidrata durante el transcurso de las primeras horas. Este intercambio de agua permite la disolución gradual del vidrio; este proceso generalmente determina la vida media útil de un electrodo. Sin embargo, la superficie de hidratación es esencial para el funcionamiento del electrodo; los electrodos nuevos sumergidos en solución responden escasamente hasta que están adecuadamente humedecidos. La hidratación establece una capa que tiene sólo 10^{-4} mm o menos de espesor. Esta capa hidratada funciona como un nivel de intercambio de iones en la cual el oxígeno cargado negativamente se une a la matriz de vidrio en los sitios en donde el Na^+ es móvil. Al sumergir el electrodo en ácido, por ejemplo, se produce el reemplazo del Na^+ por H^+ . La respuesta de la membrana a H^+ puede ser entendida en términos de un potencial de superficie que resulta del intercambio iónico de Na^+ por H^+ en el gel hidratado. La inmersión de la membrana del electrodo en solución alcalina causará el intercambio de H^+ en la membrana con Na^+ , a medida que el H^+ se moverá a la solución. El



potencial interno de la membrana se mantiene constante mediante la exposición a una actividad fija de H^+ en la solución interna. Los electrodos para Na^+ , Ag^+ y NH_4^+ han sido desarrollados variando la composición del vidrio.

Electrodos detectores de gas.

Los electrodos detectores de gas consisten en un ESI en contacto con una capa fina de electrolito acuoso que está confinado a la superficie del electrodo por una membrana externa, como su muestra esquemáticamente para un electrodo de CO_2 en la Fig. 15-7. La membrana externa es muy fina y se selecciona para que sea permeable al gas de interés; para CO_2 , la membrana está hecha de plástico de goma de silicona. Esta membrana permite pasar al gas CO_2 en la muestra a través de la membrana. La disolución del CO_2 en la capa fina de electrolito ocasiona un cambio en el pH debido a un desplazamiento de la posición de equilibrio de la reacción química mostrada en la Fig. 15-7. El cambio en el pH detectado por el electrodo interno de pH selectivo de iones es proporcional a la P_{CO_2} .

El electrodo de NH_3 en principio es idéntico al electrodo de CO_2 ; donde la solución de llenado es cloruro de amonio acuoso. El electrodo interno de pH detecta el cambio de pH del equilibrio amonio/amoniaco (NH_4^+/NH_3). El cambio de pH es por lo tanto proporcional a P_{NH_3} de la muestra.

Los electrodos de gas han sido utilizados para otras aplicaciones analíticas como la medición de CO_2 en ensayos generales de actividades enzimáticas descarboxilantes y la medición de NH_3 en tejido y suero. Las características de los electrodos de CO_2 y NH_3 se muestran en la Tabla 15-2.

Precauciones y metodología

El cuidado de los ESIs es esencialmente similar para cualquier tipo. Debido a que la punta detectora de los electrodos está hecha de materiales sumamente sensibles y frágiles, se deben tener precauciones para evitar la ruptura y mantener la punta en un medio húmedo. Muchos electrodos disponibles comercialmente son proporcionados con cubiertas protectoras para ayudar a prevenir el daño a los electrodos por falta de cuidado cuando no son utilizados. Cada electrodo está acompañado de las recomendaciones del proveedor para la limpieza específica y requisitos de almacenamiento. Las condiciones de almacenaje dependen de la frecuencia del uso, el tipo del electrodo y la aplicación. Por ejemplo, los procedimientos de limpieza son diferentes para un electrodo utilizado en una solución de proteínas y para otro empleado en una solución de iones inorgánicos. Las capas de proteína son eliminadas por el tratamiento del electrodo con pepsina, blanqueador, o HCl 0.1 M mientras que el depósito inorgánico puede ser eliminado con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) o ácidos. Posterior a cada procedimiento de limpieza, la punta del electrodo es enjuagada abundantemente con agua destilada y el electrodo es regresado a su contenedor de almacenaje.

Las mediciones de pH son realizadas fácilmente en el laboratorio clínico con un procedimiento de calibración de dos puntos. Las soluciones estándar, los cuales son asequibles comercialmente, son seleccionadas para incluir el pH de la solución de muestra. La calibración del electrodo siempre es iniciada con un amortiguador estándar de pH 7. El medidor de pH es ajustado para leer 7.00 después de que el control de la temperatura ha sido ajustado a la



temperatura del amortiguador. Enseguida, para completar la calibración se utiliza un amortiguador ácido o alcalino, dependiendo de la muestra a medir. Las muestras pueden entonces ser determinadas. Las calibraciones múltiples pueden ser necesarias para números grandes de muestras.

Para electrodos no detectores de NH_4^+ se requiere de una curva de calibración que relacione la diferencia de potencial en milivolts con la concentración. Aunque los ESIs miden actividad del compuesto analizado, la concentración debe relacionarse con los milivolts siempre y cuando la fuerza iónica sea constante entre los estándares y las muestras. Esto se logra con la adición de una pequeña cantidad de una solución de fuerza iónica elevada a los estándares de calibración. Esta solución no debe contener iones interferentes. Una gráfica del $\log (C_i)_{\text{estándar}}$ contra el potencial es lineal para un ESI que responde apropiadamente. Las concentraciones de iones en las muestras son obtenidas mediante la medición de la respuesta en milivolts y el uso de una curva de calibración. Las concentraciones iónicas de las muestras son válidas en la medida en que la matriz de las soluciones estándar sea hecha para semejarlo lo más posible a las muestras. La mayoría de los electrodos de laboratorio e instrumentos de rutina usan el procedimiento de estandarización de dos puntos para asegurar respuestas similares entre cada análisis. Se han desarrollado otros métodos de estandarización y análisis para varios electrodos y aplicaciones. En el laboratorio clínico, el análisis de números grandes de muestras es una necesidad. Por ello muchos ESIs se han incorporado a analizadores automáticos en una configuración de flujo de paso. Este arreglo aprovecha la rápida respuesta de los ESIs, colocándolos en analizadores para múltiples iones con gran capacidad de procesamiento de muestras. Los calibradores, muestras y soluciones de enjuague son bombeadas a través de las superficies de los ESIs, que están colocados en serie. Un electrodo de referencia único es utilizado para todos los ESIs en un sistema con la excepción del detector de CO_2 , el cual tiene su propio electrodo de referencia junto a la membrana permeable al gas. Los calibradores tienen una fuerza iónica constante que se semeja a las muestras fisiológicas para minimizar los errores que resultan de las diferencias en los potenciales de unión líquida entre muestras y estándares. No se puede enfatizar lo suficiente que el cuidado adecuado y uso de los ESIs en estos instrumentos es esencial para asegurar análisis exactos y reproducibles. Esto requiere del monitoreo constante del desempeño tanto de los electrodos individuales como del instrumento como un todo. La siguiente sección es una discusión de algunos de los errores más comunes y las interferencias que pueden ocurrir con las mediciones de ESI.

Consideraciones experimentales e interferencias

Puede haber errores en las mediciones ESI para cualquier determinación iónica si los estándares y muestras no se determinan aproximadamente a la misma temperatura, ya que la ecuación de Nernst es dependiente de la temperatura. Tal vez la fuente de error más importante es la respuesta de un ESI a un ion diferente al compuesto analizado o a un ion interferente en la muestra. Por esta razón es importante conocer las propiedades de selectividad del electrodo que se está utilizando y asegurarse que los iones diferentes al compuesto analizado, a los cuales el electrodo responde, no están presentes en cantidades suficientemente elevadas para producir una interferencia. Los componentes de ciertas muestras pueden también cambiar la sensibilidad de un electrodo por adsorción a su superficie y por lo

tanto bloquear el acceso del compuesto analizado a la superficie. Esta contaminación es un problema en las muestras que contienen especies que se adsorben a la superficie como las proteínas. Hay disponibles técnicas con electrodos sencillos para determinaciones en suero o sangre, que aíslan el ESI del contacto directo con la muestra. Sin embargo, la demanda análisis de iones y de muestras múltiples ha hecho poco práctico el uso de electrodos sencillos. Los analizadores modernos para múltiples iones incorporan una membrana de microexclusión que protege la membrana selectiva de los componentes de alto peso molecular de los líquidos biológicos, pero permite que las moléculas del compuesto analizado alcancen los electrodos.

Aunque muchos electrodos son muy selectivos, bajo ciertas condiciones algunos iones pueden interferir y provocar resultados erróneos. En la Tabla 15-2 están enumerados ejemplos específicos que son discutidos posteriormente. Las descripciones detalladas para los análisis clínicos de varios iones también se pueden encontrar en los Capítulos 24, 25 y 28.

Las mediciones de *pH* tienen pocas interferencias asociadas. El rango de *pH* en el cual hay una respuesta lineal es de 2 a 12. La sensibilidad de electrodo de *pH* de vidrio puede disminuir en valores de *pH* arriba de 10 debido a la interferencia de cationes monovalentes, especialmente Na^+ . Aunque los cationes monovalentes pueden penetrar y moverse lentamente a través de la capa de hidratación, los cationes multivalentes 2^+ o 3^+ no interfieren. En soluciones de *pH* menor a 1, las bajas actividades del agua producen mediciones erróneas.

Los iones Na^+ son determinados tanto por el electrodo de vidrio como por el de membrana líquida y polimérica. Las interferencias son mínimas debido a la alta concentración de sodio en los líquidos biológicos, especialmente la sangre. Debido a esta razón el electrodo de vidrio muestra excelente selectividad respecto a K^+ e H^+ . Las muestras de orina muy ácidas son una excepción. Sin embargo, los ESIs basados en polímeros pueden estar sujetos a interferencia por Li^+ si un paciente está siendo tratado con un compuesto de litio.

El K^+ es determinado comúnmente mediante el electrodo de valinomicina/polímero descrito con anterioridad. Se han obtenido buenos resultados para mediciones en sangre; sin embargo, en muestras de orina sin diluir puede haber un error negativo ocasionado por la partición de un componente lipofílico cargado negativamente que es permeable al polímero. Este componente puede ser excluido por el uso de ESIs con membrana de plástico de silicona en vez del polímero. Alternativamente, se pueden obtener mediciones exactas por la dilución de la muestra.

La determinación niveles de Na^+ y K^+ en muestras de sangre u orina no diluidas requiere atención especial. Las mediciones hechas por el método del ESI sin dilución pueden diferir de los resultados obtenidos por espectroscopía de absorción atómica de flama (EAAF), que determina la concentración de los iones en el volumen total de muestra. En contraste, el método del ESI mide la actividad de los iones en la muestra. Debido a que la actividad puede ser afectada por el ambiente de la muestra (como el contenido de agua y proteínas), pueden ocurrir desviaciones entre los métodos. La concordancia entre estos métodos es frecuentemente alcanzada por dilución de la muestra. Las diferencias metodológicas pueden ser mayores en el caso de las determinaciones de Na^+ debido a la alta concentración relativa de Na^+ en los fluidos biológicos. La influencia de los efectos fisiológicos sobre las determinaciones de Na^+ y K^+ en fluidos biológicos será discutida con detalle posteriormente.

Se debe tener mucho cuidado en la determinación de Ca^{++} . El calcio existe tanto en forma unida (a proteínas u otras moléculas biológicas) como en forma libre, en forma de Ca^{++} ionizado. El ESI para Ca^{++} es una de las formas más fáciles de medir Ca^{++} ionizado, ya que responde a la forma ionizada, la cual se cree que es la forma fisiológicamente importante.

La determinación de Cl^- en fluidos biológicos por un ESI presenta fallas frecuentes de la superficie debido a la presencia de proteínas en la muestra. Este problema puede ser minimizado cuando se utiliza la membrana semipermeable descrita anteriormente para excluir las moléculas grandes de la superficie del electrodo. Recientemente se ha desarrollado y utilizado en analizadores de electrolitos de uso biomédico un electrodo de membrana líquida con polímero que exhibe selectividad por el cloro. El ESI de cloro está sujeto a interferencia por Br^+ , I^- , F^- , CN^- , OH^- y S^{--} , aunque, con excepción del Br^- , estos iones no están normalmente presentes en muestras biológicas en niveles suficientemente elevados para interferir.

El ESI de F^- muestra excelente selectividad y sólo registra interferencia con OH^- a pH elevado. Los ESIs para medición de CO_2 son relativamente fáciles de usar y están libres de interferencia. La sangre sin diluir puede ser utilizada directamente como muestra y la calibración está acompañada con mezclas de CO_2 en un gas inerte al 5 y 10%. Las mediciones de CO_2 total requieren de acidificación para convertir el CO_2^{--} y el HCO_3^- a CO_2 . En este caso, la calibración se realiza con soluciones estándar de $NaHCO_3$. Los tiempos de respuesta para las mediciones de CO_2 total, generalmente son prolongados debido a la necesidad de establecer condiciones de equilibrio. Los iones interferentes son principalmente ácidos orgánicos para los cuales la membrana de gas también es permeable.

Las membranas selectivas de carbonato están sujetas a interferencias por aniones tales como el salicilato, pero la colocación del ESI tras una membrana de plástico de silicona soluciona este problema.

El ESI de NH_3 responde selectiva y rápidamente a la concentración de amoníaco en solución. El mayor problema es la cuestionable estabilidad de la membrana y el electrodo. Puede existir interferencia por aminas volátiles no polares en la muestra. Es importante tener un electrodo de respuesta rápida tanto para el CO_2 como para NH_3 . Una disminución en el tiempo de respuesta significa una pérdida en precisión del electrodo y probablemente reposición de la membrana.

Métodos Voltimétricos

Las técnicas electroquímicas en las cuales el potencial es aplicado a una celda electroquímica y se mide la corriente resultante de una reacción electroquímica, generalmente se catalogan como métodos *voltimétricos*. Las celdas electroquímicas para voltimetría utilizan una configuración de tres electrodos. La celda consiste en un *electrodo de trabajo*, un *electrodo de referencia* y un *electrodo auxiliar*. El potencial es aplicado entre el electrodo de referencia y el de trabajo por un *potenciostato*; este potencial aplicado puede forzar que las cargas se asocien a cualquier especie eléctricamente activa en la superficie del electrodo de trabajo mediante *electrólisis*. La electrólisis puede ocurrir por una *reducción*, ganancia de electrones, o una *oxidación*, pérdida de uno o más electrones. El electrodo auxiliar proporciona la

corriente requerida para sostener la electrólisis en el electrodo de trabajo y mantener la neutralidad eléctrica en la celda. Este arreglo evita que el electrodo de referencia sea sometido a corrientes grandes que puedan cambiar su potencial. Algunos instrumentos voltimétricos están basados en el sistema de dos electrodos. En ellos el electrodo auxiliar está ausente y el electrodo de referencia está sujeto a la corriente íntegra de la celda.

El concepto básico de aplicación de un potencial a una celda electroquímica y la medición de la corriente que resulta de la electrólisis, puede ser implementado de numerosas formas. Se han desarrollado diferentes técnicas con variaciones en la forma de aplicación del potencial o de la medición de la corriente. Aunque el producto resultante y las aplicaciones de estas técnicas son variadas, todas funcionan bajo la base común de aplicar un potencial, E , y medir la corriente, i , o la carga, Q . Además, la solución puede ser móvil o estacionaria respecto al electrodo de trabajo.

La voltimetría en un solución sin agitación se denomina voltimetría de solución *estacionaria*. La voltimetría *hidrodinámica* involucra el movimiento forzado de la solución ya sea mediante la agitación o flujo de la solución sobre el electrodo como en la *cromatografía de líquidos con detección electroquímica* (CLEQ).

El resultado de una técnica voltimétrica se denomina un *voltigrama* (esto es, una curva de corriente contra potencial). Los voltigramas proporcionan información útil cualitativa y cuantitativa acerca de la reacción electroquímica. En la Fig. 15-8 se muestra un voltigrama hidrodinámico típico para la reducción de las especies Ox por un electrón de las especies Red . Cuando el potencial se explora en la dirección negativa, el voltigrama muestra tres regiones diferentes. En la región A, el potencial aplicado al electrodo de trabajo es insuficiente para provocar la electrólisis; por lo tanto no se observa corriente. El inicio de la electrólisis está señalado por el incremento de la corriente en la región B. La corriente continúa elevándose hasta llegar a un valor máximo. Esta es la región C, donde la electrólisis está ocurriendo a la máxima velocidad posible. La corriente máxima en la región C está definida como la *corriente limitante* (i_l) y está definida por la ecuación 15-5:

$$i_l = nFAD_0C_0 \quad \text{Ec. 15-5}$$



donde A es el área del electrodo, D_0 es el coeficiente de difusión de Ox , C_0 es la concentración de Ox , y Δx es la distancia de difusión. Como se ilustra en la ecuación 15-5, la magnitud de i_l es directamente proporcional a la concentración del compuesto analizado electroquímicamente activo. Por lo tanto la voltimetría puede ser utilizada para medir cuantitativamente la concentración de un compuesto. La unidad práctica para la corriente es el amperio (A), el cual es la transferencia de un culombio de carga por segundo. Esto corresponde al paso de 1.05×10^{-5} moles de electrones por segundo. Debido a que la corriente involucrada en la mayoría de las técnicas electroanalíticas es muy pequeña, las unidades comúnmente utilizadas son los miliamperios (mA), microamperios (μA) y nanoamperios (nA). El *potencial de media onda* ($E_{1/2}$) está definido como el potencial a la mitad de la corriente limitante. $E_{1/2}$ es característico únicamente de las especies sujetas a electrólisis en la misma forma que el potencial de media celda lo es para el electrodo de referencia, y puede ser utilizado para la identificación cualitativa. Por convención, una reducción se describe como una corriente positiva, o *catódica*, mientras que una oxidación se describe como una corriente

negativa o *anódica*. Los principios para una oxidación son similares y pueden ser aplicados para realizar una exploración del potencial positivo.

Un tipo específico de voltimetría que es clínicamente útil es la amperimetría. Los sensores de amperimetría son aparatos que miden la corriente generada por un compuesto eléctricamente activo en una solución, a un potencial fijo. El potencial es fijado a un valor de E donde ocurre i_l (ver Fig 15-8, región C), y donde para cada muestra se mide i_l . La corriente medida es directamente proporcional a la concentración de las especies presentes. A continuación se describen tres sensores amperométricos clínicamente importantes: el electrodo de oxígeno, el electrodo de glucosa y la cromatografía de líquidos con detección electroquímica (CLEQ).

Electrodos voltimétricos

Electrodos de trabajo.

Los electrodos de trabajo tienen ciertas propiedades en común. La más importantes es una buena conductividad eléctrica. Consecuentemente, los electrodos de trabajo son generalmente metales o semiconductores. Es muy importante que los electrodos sean inertes química y electroquímicamente debido a que su principal aplicación es transferir electrones de y hacia las especies en solución. Esta característica de poca o nula reactividad proporciona una región amplia de potencial con contribuciones mínimas de fondo del electrodo y propiedades redox del solvente, en la cual la electroquímica del compuesto o compuestos analizados pueda ser fácilmente determinada. El platino, oro, mercurio y carbón vidriado son materiales comúnmente utilizados para los electrodos voltimétricos. El mercurio puede ser utilizado en la forma de *electrodo de gota colgante de mercurio*, cuando se usa para voltimetría. Para obtener la superficie del electrodo de trabajo, se puede producir la protuberancia de una gota de mercurio reproducible a través de un capilar angosto de vidrio mediante una jeringa micrométrica disponible comercialmente. Se puede formar una nueva gota simplemente descargando la gota antigua y exponiendo más mercurio. El *electrodo de gota de mercurio* es el electrodo de trabajo para *polarigrafía*. En esta técnica, el mercurio se empuja por gravedad a través de un capilar fino para obtener una corriente continua de gotas idénticas. Cada gota se expande, se vuelve muy pesada para estar suspendida y se libera del capilar.

Electrodos auxiliares.

Los electrodos auxiliares están hechos de cualquier material conductor, típicamente un alambre de platino.

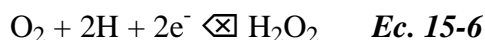
Electrodos de referencia.

Los electrodos de referencia más comúnmente utilizados son los SCE y los electrodos de Ag/AgCl, los cuales ya han sido descritos previamente en detalle.

Electrodo de oxígeno

El electrodo de oxígeno está diseñado como una celda electroquímica completa. El diseño básico, el cual se muestra en la Fig. 15-9, incorpora un disco de platino como cátodo y un electrodo de Ag/AgCl como ánodo en una solución electrolítica amortiguada. La celda electrolítica está aislada de la muestra por una membrana permeable al oxígeno. El oxígeno difunde a través de la membrana y es reducido electroquímicamente en el electrodo de platino,

el cual es mantenido a un potencial que reduce equivalentemente al oxígeno (-0.5 a 0.6V contra Ag/AgCl).



La corriente generada en el electrodo de platino es directamente proporcional a la concentración (presión parcial) de oxígeno disuelto en la muestra. De manera semejante a los electrodos indicadores, la membrana inhibe las interferencias ocasionadas por las proteínas en sangre y también evita que se reduzcan en el electrodo otras sustancias electroactivas. La calibración del sistema de electrodos se realiza con soluciones estándar de gases conteniendo concentraciones conocidas de oxígeno.

Pocas interferencias están asociadas con el uso del electrodo de oxígeno. Los tiempos de respuesta bajos y resultados variables pueden indicar la degradación de la membrana o un cambio de pH de la solución amortiguadora. La plata metálica se puede depositar en el electrodo de platino y también afectar la respuesta del electrodo. El pulido del electrodo con un compuesto apropiado regenerará la superficie del platino.

El electrodo de oxígeno es normalmente incorporado en el analizador de gases sanguíneos, el cual mide rutinariamente oxígeno, CO_2 , y pH en muestras menores a 250 μL de sangre total. Se han desarrollado electrodos miniaturizados de O_2 que pueden ser utilizados para mediciones transcutáneas, eliminando la necesidad de obtener muestras de sangre. Sin embargo, la exactitud y el tiempo de respuesta de estos electrodos dependen de las características físicas del tejido cutáneo del paciente. El electrodo de oxígeno se ha utilizado para determinar muchas reacciones que involucran el consumo de oxígeno para medir glucosa (glucosa oxidasa), colesterol (colesterol oxidasa) y ácido úrico (uricasa)

Electrodo de glucosa

Otro constituyente importante del suero o plasma que puede ser medido por un electrodo amperométrico es la glucosa. En la Fig. 15-10 se muestra un diagrama de un electrodo de glucosa típico. El diseño básico de este electrodo utiliza la enzima glucosa oxidasa, inmovilizada entre dos membranas. La glucosa oxidasa reacciona con la glucosa de la muestra para generar peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y ácido glucónico. La membrana interna es permeable al H_2O_2 , la cual es determinada amperimétricamente por el electrodo de platino fundamental, mantenido a un potencial positivo suficiente para oxidar el H_2O_2 a O_2 (la reacción inversa a la mostrada en la ecuación 15-6). La corriente obtenida de la oxidación del H_2O_2 es directamente proporcional a la concentración de la glucosa; las concentraciones de glucosa pueden ser cuantificadas en el rango de 10^{-7} a 10^{-3} M. Se han reportado pocas interferencias para este electrodo. La membrana interna es impermeable al ácido ascórbico, ácido úrico y acetaminofén, los cuales son electroactivos a potenciales positivos y pueden estar presentes en muestras clínicas. El electrodo de glucosa puede ser limitado por el abatimiento de oxígeno en la solución amortiguadora interna. La investigación actual busca construir generaciones futuras de electrodos de glucosa que superen este problema. El diseño de este electrodo de glucosa ha sido desarrollado por la compañía de instrumentos Yellow Springs (Yellow Springs, Ohio).



Cromatografía de líquidos con detección electroquímica

La cromatografía de líquidos con detección electroquímica (CLEQ) es una técnica híbrida que combina la cromatografía con la electroquímica. Como se discutió en los Capítulos 5 y 6, la cromatografía de líquidos de alta eficacia provee de medios para separar varios componentes de soluciones mediante el uso de sus afinidades químicas a los materiales de empacado de las columnas. En CLEQ, los materiales electroactivos son medidos secuencialmente a medida que eluyen de la columna cromatográfica y fluyen a través o dentro del electrodo de trabajo. Se pueden obtener límites de detección muy bajos (aproximadamente 1 pmol) con instrumentación relativamente simple. Como resultado de esas características, la CLEQ ha sido reconocida como una herramienta poderosa para las determinaciones en cantidades traza de muchas biomoléculas clínicamente importantes. Estas incluyen algunos metabolitos del sistema nervioso central que son fácilmente oxidados o reducidos en la superficie del electrodo.

Para optimizar la determinación de la CLEQ, es necesario considerar ambos requerimientos cromatográficos y electroquímicos simultáneamente. Un requisito básico para la detección electroquímica es que la fase móvil tenga una conductividad relativamente alta. Para este fin, se emplean típicamente las fases móviles de fuerza iónica moderada (0.01 a 0.1M). Muchas de las aplicaciones de la CLEQ utilizan columnas cromatográficas de fase inversa, intercambio iónico o de par iónico para la separación (ver capítulo 6). Para acortar la retención cromatográfica se pueden añadir cantidades significativas (hasta 90% v/v) de modificadores orgánicos como el metanol, acetonitrilo y propanol. La especificidad inherente de la detección electroquímica es de gran ventaja en la CLEQ, ya que únicamente son detectados los compuestos electroactivos al potencial aplicado. De esta forma son eliminadas muchas interferencias que tienen tiempos de retención cromatográfica similares. Por esta razón, la preparación de la muestra puede ser simple en comparación con otros métodos de detección disponibles para la cromatografía de líquidos de alta eficacia.

Muchas aplicaciones CLEQ utilizan un electrodo de trabajo único en un sistema convencional de tres electrodos (ver Capítulo 6). La selección del material del electrodo de trabajo es una consideración importante en la CLEQ. Cuando se aplican potenciales positivos la pasta de carbón, una mezcla de polvo de grafito y un coagulante como el aceite de parafina, exhiben corrientes bajas de fondo y son útiles para aplicaciones oxidativas. Desafortunadamente, los electrodos de pasta de carbón son incompatibles con fases móviles que contienen cantidades significativas de algún modificador orgánico. Los electrodos de carbón cristalizado son compatibles con los modificadores y pueden ser utilizados en potenciales negativos. Los electrodos de amalgama de mercurio o mercurio-oro tienen las mejores características cuando se operan a potenciales negativos, y son utilizados principalmente para la CLEQ reductiva. Cualquiera de estos tipos de superficies de electrodo pueden fallar o ser ineficientes cuando se detectan concentraciones elevadas de algunos compuestos. Además, las concentraciones elevadas de proteínas y otras moléculas grandes pueden dar lugar a fallas del electrodo. Esto resultará en resultados no reproducibles. Para minimizar la pérdida permanente de precisión del electrodo, se han desarrollado procedimientos de limpieza física y química.

Para obtener la mejor sensibilidad del detector y los mejores límites de detección, es importante saber el potencial mínimo que se requiere aplicar al electrodo para que ocurra la reacción electroquímica deseada. Esto frecuentemente se logra mediante la obtención de un



voltigrama (Fig. 15-8) de cada componente determinado. Para generar el voltigrama, se hacen inyecciones múltiples aplicando varios potenciales del detector y la corriente es graficada como una función del potencial. Para alcanzar la máxima sensibilidad, el potencial aplicado debe ser elegido de tal forma que las oxidaciones o reducciones observadas ocurran en la corriente limitante para todos los compuestos a detectar.

En el análisis biomédico la CLEQ se ha convertido en una técnica analítica ampliamente utilizada. Aunque el espacio no permite una revisión completa de todas las aplicaciones bioquímicas, es importante considerar muchas clases generales de compuestos cuantificables por ambas técnicas, reductivas y oxidativas. La Tabla 15-4 proporciona los potenciales de oxidación aproximados obtenidos de voltigramas hidrodinámicos, que son utilizados para cuantificar por CLEQ algunos compuestos importantes desde el punto de vista neuroquímico.

Aplicaciones oxidantes.

Muchos fenoles son rápidamente oxidados en electrodos de carbón. La primera y todavía la más común de las aplicaciones de la CLEQ es la determinación de catecolaminas en muestras biológicas. Un segundo uso más importante de la CLEQ es la determinación de los metabolitos de hidroxindol derivados del triptofano. Recientemente, ha sido desarrollado un inmunoensayo enzimático electroquímico en el cual los fenoles son detectados como el producto electroactivo de la reacción enzimática. Las aminas aromáticas pueden ser oxidadas en los electrodos de carbón para ser analizadas por CLEQ.

Muchos compuestos de interés biomédico tienen estructura heterocíclica y son electroactivos a potenciales que se alcanzan fácilmente utilizando CLEQ. Se han desarrollado métodos para la determinación de compuestos heterocíclicos como el ácido ascórbico, ácido úrico, nicotin adenin dinucleótido reducido (NADH), biotina, y los folatos. Aunque la mayoría de los aminoácidos no son electroactivos a potenciales que se pueden utilizar analíticamente con electrodos de carbón reducido, se han desarrollado métodos de obtención de derivados que resultan en productos electroactivos. Estos métodos proporcionan excelentes determinaciones de aminoácidos. Los tioles también pueden ser determinados en el electrodo de amalgama de oro-mercurio.

Aplicaciones reductoras.

Debido a las dificultades presentadas por las interferencias del oxígeno y de las cantidades traza de iones metálicos a potenciales negativos, no se han establecido aplicaciones adecuadas de la CLEQ reductora en gran escala. Estos problemas pueden ser superados estableciendo procedimientos de remoción de oxígeno y el uso de sales de alta pureza, llevando a más aplicaciones clínicas de la CLEQ reductora.

Los compuestos aromáticos nitro y nitroso son fácilmente reducidos en los electrodos de carbón o mercurio. Otros compuestos nitro como los ésteres de nitrato, nitroaminas y nitrosaminas son también fácilmente reducidos. Además, algunos compuestos heterocíclicos de interés clínico pueden ser detectados mediante CLEQ reductora, incluyendo las vitaminas K, las pterinas y algunos fármacos.

Voltimetría de remoción anódica

La *voltimetría de remoción anódica* es una técnica voltimétrica muy utilizada en química



clínica para la determinación de metales pesados. Un ejemplo de su uso es la determinación de Pb^{2+} en fluidos biológicos de pacientes en los que se sospecha una exposición a plomo. La voltimetría de remoción tiene el límite de detección más bajo de las técnicas electroanalíticas utilizadas. Se han determinado concentraciones de compuestos hasta de 10^{-10}M . La técnica consiste en dos pasos. En el primer paso, el compuesto analizado es depositado en el electrodo de mercurio. Este paso sirve para preconcentrar el compuesto a analizar mediante la extracción electroquímica del mismo a un electrodo de mercurio. Es esta facultad de preconcentración la que favorece la cuantificación de concentraciones muy bajas mediante un sistema de voltimetría de remoción. En el segundo paso, el compuesto depositado es retirado, o “removido” del electrodo por aplicación de potenciales positivos crecientes, la señal de corriente resultante es la medida de la concentración del compuesto analizado en solución. Dado que el paso de remoción provoca una corriente anódica (esto es, la especie está oxidada), la técnica se denomina “voltimetría de remoción anódica”.

En la voltimetría anódica de remoción únicamente una fracción del compuesto analizado total es depositada dentro del electrodo de mercurio por electrólisis durante el paso de preconcentración. El depósito completo de todo el compuesto analizado dentro del electrodo consume tiempo y es generalmente innecesario, ya que normalmente se pueden depositar concentraciones adecuadas dentro del electrodo para dar una señal satisfactoria de remoción en tiempos más cortos. Debido a que la acción de depositar la sustancia a analizar no es exhaustiva, es importante depositar la misma fracción de compuesto analizado en cada voltigrama de remoción. Los parámetros del área superficial del electrodo, tiempos de deposición, y agitación de la muestra deben ser duplicados cuidadosamente para todos los estándares y muestras. El tiempo de depósito varía entre 60 segundos y 30 minutos, dependiendo de la concentración de compuesto analizado, el tipo de electrodo de trabajo y la técnica de remoción.

La voltimetría de remoción anódica ha llegado a ser un método útil en el laboratorio clínico para la determinación del Pb^{++} en sangre y orina a partir del desarrollo de instrumentación automatizada por Environmental Science Associates (ESA). La ESA también comercializa un reactivo de digestión, Meterchange, el cual libera el Pb^{++} de los componentes biológicos de la sangre y la orina. Los procedimientos detallados para la determinación del Pb^{++} en sangre y orina por voltimetría de remoción anódica pueden consultarse en la literatura.

Métodos Coulométricos

La coulombimetría es un método muy útil para el análisis cuantitativo. Las aplicaciones clínicas utilizan una forma de coulometría que involucra la aplicación de una corriente constante para generar un agente valorante. En principio, se mide el tiempo requerido para titular una muestra a corriente constante la cual está relacionada con la cantidad del compuesto analizado en la muestra mediante la ley de Faraday.

$$Q = it = nFN \quad \text{Ec. 15-7}$$

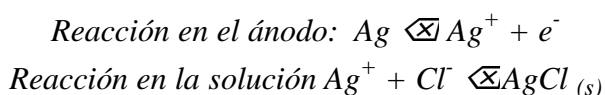
donde Q es la carga que pasa en un tiempo finito, t , a corriente constante i ; n es el número de electrones involucrados en la reacción electroquímica; F es la constante de Faraday; y N es el número de moles del compuesto analizado en la muestra. La carga es una cantidad de



electricidad. La unidad de carga es el coulomb (C) y corresponde a 1.05×10^{-5} moles de electrones. En virtud de que N es medida directamente sin necesidad de estándares, la coulometría es un método absoluto y puede ser utilizado para determinaciones precisas de un compuesto.

Titulación de cloruro

Aunque no es de uso corriente, la determinación coulométrica de cloruro es de importancia histórica y ha sido empleada para la determinación de Cl^- en suero, plasma, orina, y otros fluidos corporales. El análisis de Cl^- aprovecha la formación cuantitativa y la baja solubilidad del AgCl . Los iones Ag^+ (el agente titulante) son generados electroquímicamente en el ánodo de plata por aplicación de una corriente constante. Los iones Cl^- en la muestra son rápidamente consumidos tan pronto como reaccionan con Ag^+ para formar el AgCl insoluble. En cualquier punto de la titulación, la concentración de Ag^+ es muy baja.



Sin embargo, el punto final es indicado por un incremento súbito de la concentración de Ag^+ que sigue al consumo total de el Cl^- . Un segundo par de electrodos específicos de Ag^+ detectan la elevación en la concentración de iones plata en solución e inmediatamente detienen la titulación. La cantidad de Cl^- en la muestra es proporcional a la cantidad de iones Ag^+ generada en el ánodo.

La determinación coulométrica de cloro es muy precisa; sin embargo, otros iones que forman complejos insolubles con el ion plata pueden provocar determinaciones de Cl^- erróneamente elevadas. La baja reproducibilidad puede ser un problema a concentraciones altas de cloro debido a la gran cantidad de precipitado.

Bibliografía

General

Koryta J, Dvorak J, Kavan L: *Principles of electrochemistry*, ed 2, New York, 1993, Wiley & Sons.
Wang J: *Electroanalytical techniques in clinical chemistry and laboratory medicine*, New York, 1988, VCH Publishers.

Métodos potenciométricos

Bates RG: *Determination of pH: theory and practice*, New York, 1964, Wiley & Sons.
Freiser H, editor: *Ion-selective electrodes in analytical chemistry*, vols I and II, New York, 1978, 1980, Plenum Publishing.
Koryta J, editor: *Medical and biological applications of electrochemical devices*, New York, 1980, Wiley & Sons.
Meyerhoff ME, Opdyke WN: Ion-selective electrodes, *Adv Clin Chem* 25:1, 1986.
Morf WR: *The principles of ion-selective electrodes and of membrane transport*, New York, 1981, Elsevier Science.



Simon W, Ammann D, Bussmann W, Meier PC: Ion-selective electrodes in biology and medicine. In Laidler KJ, editor: *Frontiers of chemistry*, New York, 1982, Pergamon Press.

Solsky RL: Ion-selective electrodes in biomedical analysis, *CRC Crit Rev Anal Chem* 14:1, 1982.

Métodos voltimétricos

Bard AJ, Faulkner LR: *Electrochemical methods*, New York, 1980, Wiley & Sons.

Kissinger PT, Heineman WR, editors: *Laboratory techniques in electroanalytical chemistry*, New York, 1984, Marcel Dekker.

Lunte CE, Heineman WR: Electrochemical techniques in bioanalysis, *Top Curr Chem* 143:1-48, 1988.

Electrodos para enzimas

Kessler M, Clark LC Jr, Lubbers DW, et al, editors: *Ion and enzyme electrodes in biology and medicine*, Baltimore, 1976, University Park Press.

Electrodo de fenitoína

Cosofret VV, Buck RP: A poly(vinyl chloride) membrane electrode for determination of phenytoin in pharmaceutical formulations, *J Pharm Biomed Anal* 4:45, 1986.

Biosensores

Blum LJ, Coulet PR, editors: *Biosensor principles and applications*, New York, 1991, Marcel Dekker.

Turner AFP: *Advances in biosensors*, vol 1, Greenwich, Conn., 1991, JAI Press Ltd.

Tablas

Tabla 15-1. Términos electroquímicos, unidades, constantes, símbolos y conversiones.

Término	Símbolo	Unidad o constante	Símbolo	
Conversión o valor				
Potencial	E	Volt	V	$V = J/C$
Potencial estándar	(E°)			$E = i \cdot R$
Potencial formal	(E°)			
Corriente	i	Amperio	A	$A = C/s;$
1A = 1.05 x 10 ⁻⁵ moles de electrones/s				
Carga	Q	Coulombio	C	$C = A \cdot s$
				$1C = 1.05 \times 10^{-5}$
mol de electrones				
Energía	H	Joule	J	
Resistencia	R	Ohm	Q	
Tiempo	t	Segundo	s	
Temperatura	T	Kelvin	K	
Actividad	a	Moles por litro	mol/L	

Concentración	C	Moles por litro o por cc	mol/L	
Area	A	Centímetros cuadrados	cm ²	
Coefficiente de difusión	D	Centímetros cuadrados por segundo	cm ² /s	
		Constante de los gases	R	8.31441
		Constante de Faraday	F	
		Número de electrones en el electrodo o reacción redox	n	
J/mol · K				
9.64846 x 10 ⁴ C/mol				

Tabla 15-2. Electrodo selectivos de iones (ESIs) utilizados en química clínica.

Tipo de electrodo	Compuesto analizado	Composición de la membrana	Rango de respuesta lineal (mmol/L)	Interferencias posibles
Vidrio	H ⁺	SiO ₂ 72.17%, CaO 6.44%, Na ₂ O 21.39% (mol %)	10 ⁻⁸ a 10 ⁻²	Na ⁺
	Na ⁺	NaO 11%, Al ₂ O ₃ 18%, SiO ₂ 71%	10 ⁻⁶ a 10 ⁻¹	K ⁺ , Ag ⁺
Estado sólido	F ⁻	Cristales de LaF ₃	10 ⁻⁶ a saturación	OH ⁻
	Cl ⁻	Ag ₂ S/AgCl	5 x 10 ⁻⁵ a 1	Br ⁻ , CN ⁻ , S ₂ ⁻
Membrana líquida o polimérica	Na ⁺	Éter 2-nitrofeniloctílico del ionóforo de Na ⁺ (ETH 227), tetrafenilborato de sodio	10 ⁻³ a 10 ⁻¹	Li ⁺ , K ⁺ , Ca ⁺⁺
	Cl ⁻	Cloruro de tri-n-octilpropilamonio decanol	10 ⁻³ a 10 ⁻¹	OH ⁻ , Br ⁻ , F ⁻
	K ⁺	Valinomicina, dioctiladipato, PVC	3 x 10 ⁻⁵ a 1	NH ₄ ⁺
	Li ⁺	Ionóforos de Li ⁺ , como los éteres de corona	10 ⁻⁴ a 10 ⁻²	Ca ⁺⁺ , Na ⁺

	Ca^{++}	Eter 2-nitrofeniloctílico del ionóforo de Ca^{++} (ETH 1001), tetrafenilborato de sodio	10^{-7} a 10^{-2}	—
	Ca^{++}	Di (n-decil)fosfato de calcio, di (n-octopentil)fosfonat PVC.	3×10^{-5} a 1	Mg^{++}
Sensores de gas	CO_2	Electrodo combinado de vidrio pH, solución de llenado NaHCO_3 0.01 - 0.1 M- NaCl , detrás de la membrana de goma de silicón	10^{-4} a 10^{-1}	Ácidos orgánicos
	NH_3	Electrodo combinado de vidrio pH, solución de llenado NH_4Cl 0.1 M; detrás de la membrana porosa de Teflón permeable al gas	10^{-5} a 5×10^{-2}	Aminas volátiles
Modificada de: Meyerhoff ME, Opdycke WN: Adv Clin Chem 25:1-47, 1986				

Tabla 15-3. Aplicación de la CLEQ al análisis de drogas.

Clase	Compuesto
Analgésico fenacetina, ac.	Acetaminofén, codeína, naproxen, salicílico, cetobemidona, morfina
Tranquilizante	Diacepam
Anticonvulsivante	Nitracepam
Antibacteriano	Amoxicilina
Bloqueador adrenérgico	Labetalol, mepindolol
Antineoplásico procarbazina	Metotrexate, hidrocloreuro de
Relajante muscular	Teofilina
Antihipertensivo	Hidrocloreuro de sulfinalol
Antituberculosos	Rifampin
Antipsicótico	Clorpromazina
Antiartrítico	Penicilamina



Modificado de: Lunte CE, Heineman WR: *Top Curr Chem* 143: 1-48, 1988.

Tabla 15-4. Potenciales de oxidación aproximados de compuestos neuroquímicos importantes.

Compuesto oxidación	Potencial de
Dopamina	0.3 V
Epinefrina	0.3 V
5-Hidroxiindolacético (5-HIAA)	0.3 V
Norepinefrina	0.3 V
Ácido ascórbico	0.3 V
Ácido vainillil mandélico (VMA)	0.6 V
Metanefrina	0.6 V
Normetanefrina	0.6 V
3-Metoxi-4-hidroxifenilglicol (MHPG)	0.7 V
Ácido homovanílico (HVA)	0.7 V
Modificado de: Lunte CE, Heineman WR: <i>Top Curr Chem</i> 143: 1-48, 1988	

Figuras

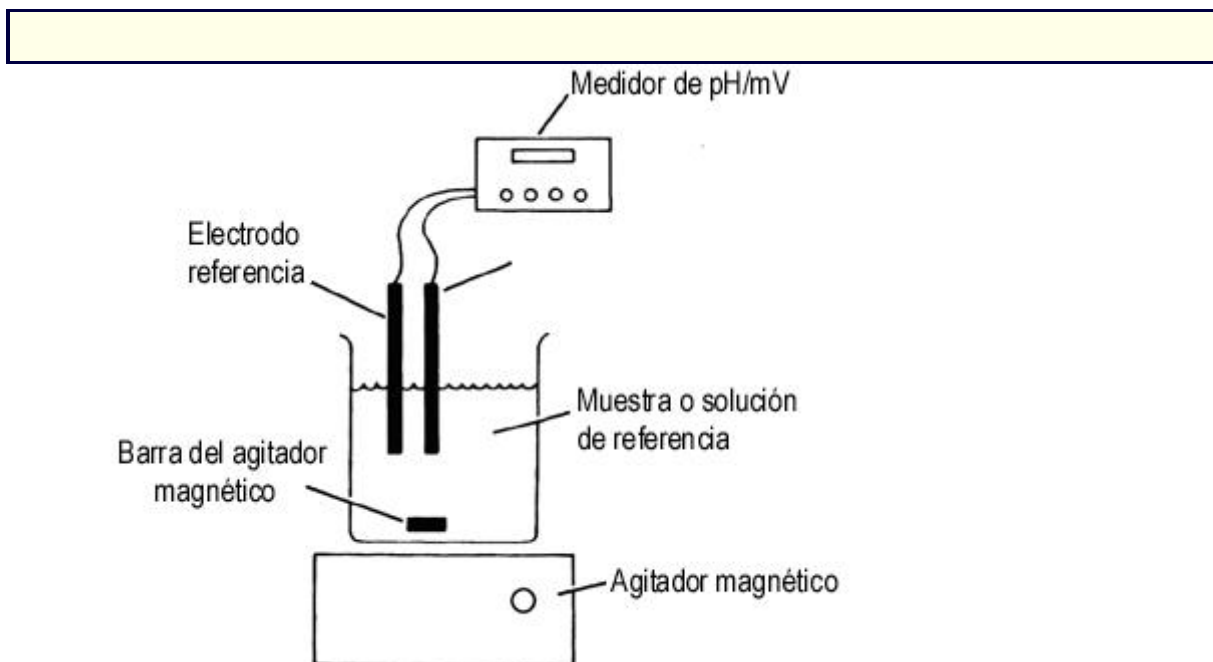


Figura 15-1 Esquema de un aparato de potenciometría.

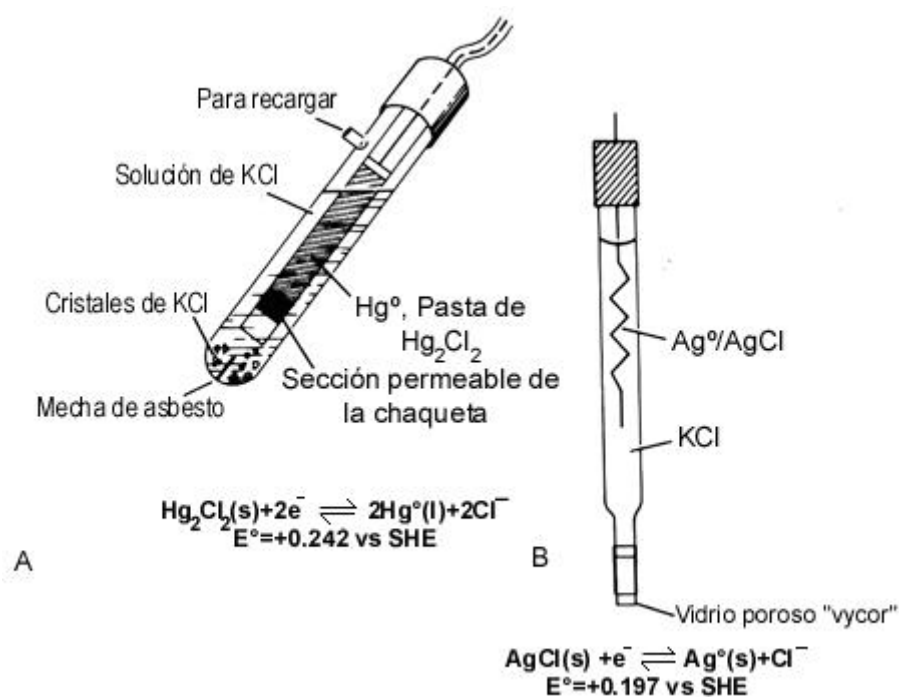


Figura 15-2 Electrodos de referencia. *A*, Electrodo saturado de calomel, ESC, con cama de asbesto para la unión del puente salino. *B*, Electrodo de plata/cloruro de plata, Ag/AgCl.

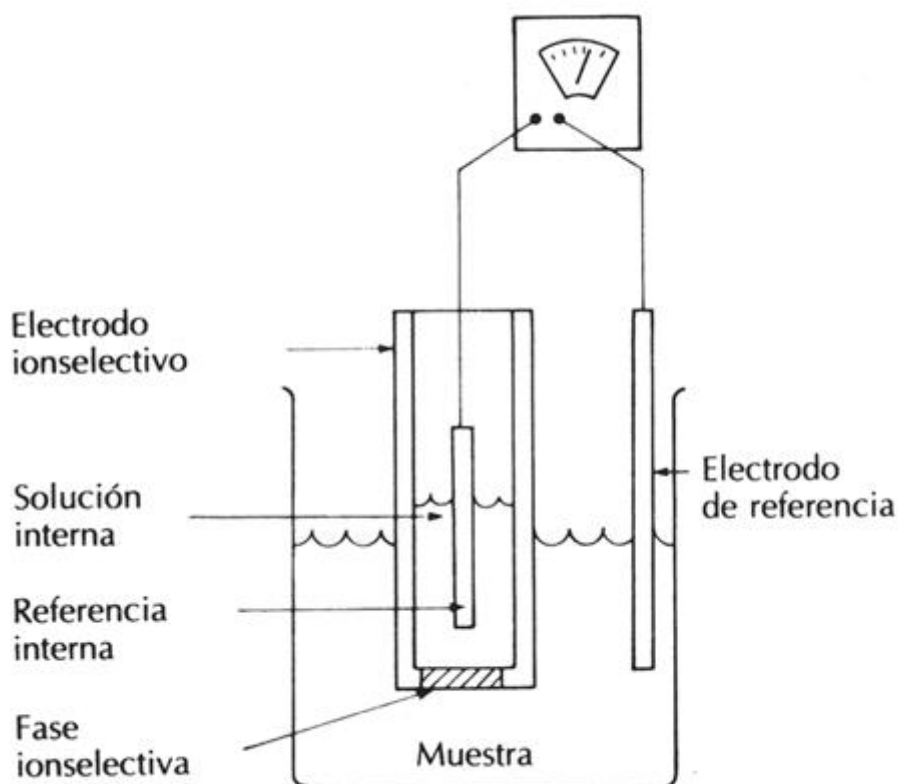


Figura 15-3 Esquema de un electrodo selectivo de iones (ESI).

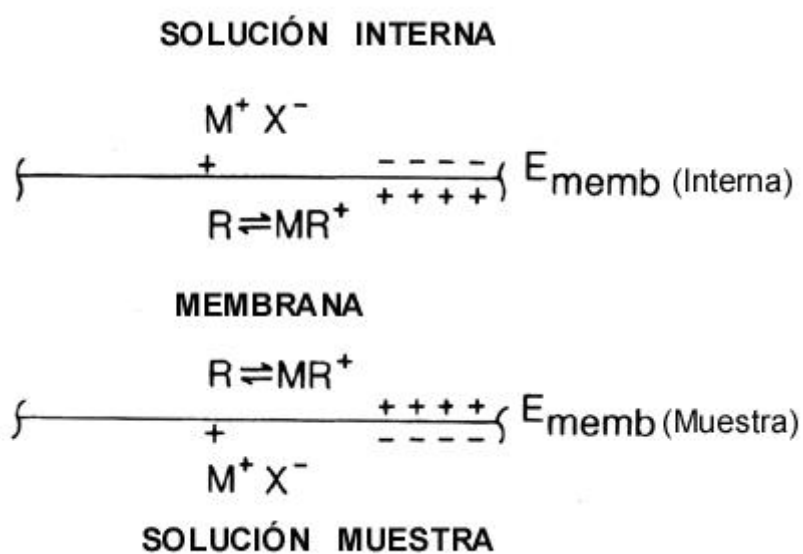


Figura 15-4 Esquema de una membrana líquida del ESI, donde M^+ representa un catión como el compuesto analizado y R representa un ionóforo acarreador neutral.

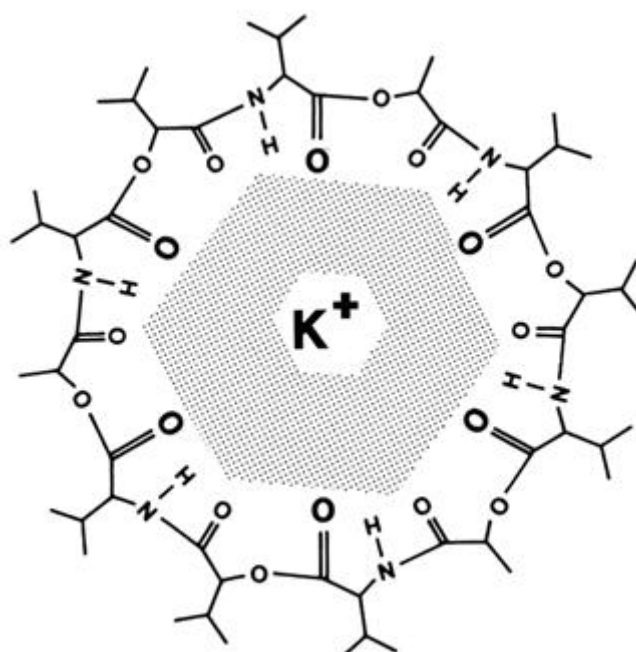


Figura 15-5 Modelo del complejo de valinomicina K^+ . La región sombreada representa el ion K^+ . Los oxígenos en negritas son átomos de unión

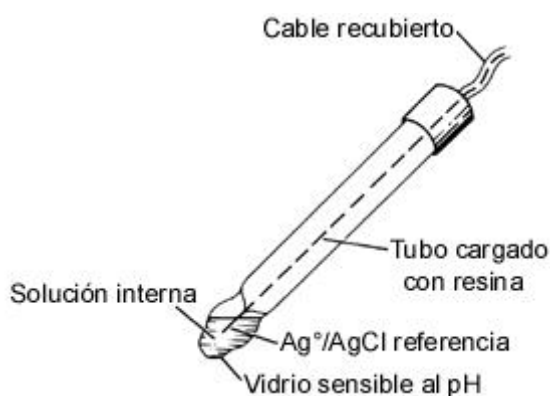


Figura 15-6 Electrodo de pH representativo. Usualmente sólo la membrana de la punta del bulbo del electrodo es de vidrio selectivo a iones H^+ .

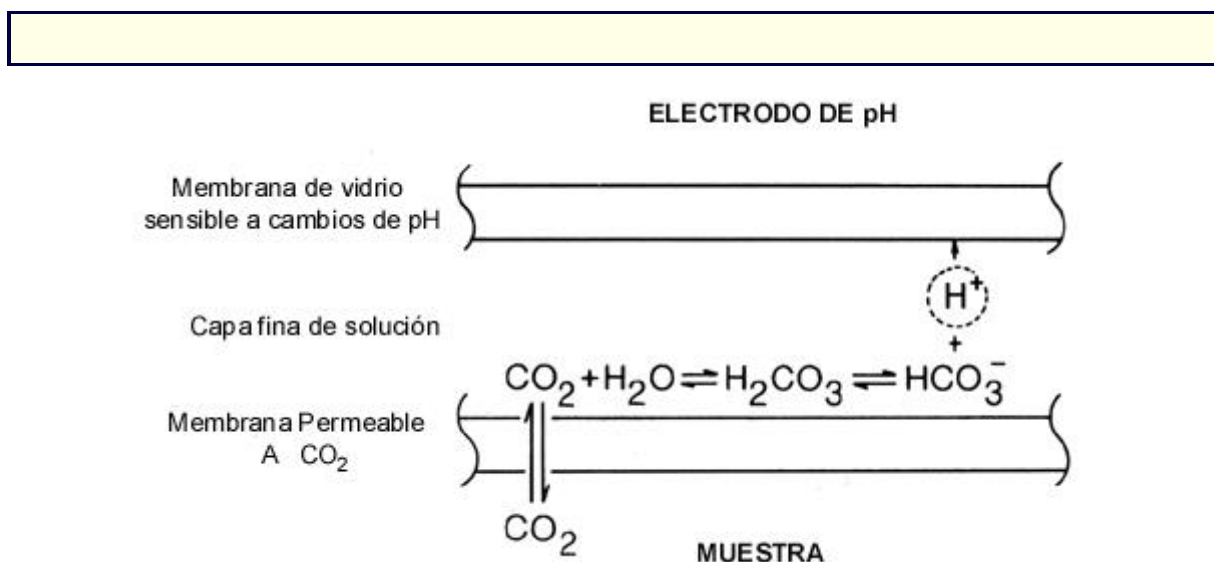


Figura 15-7 Esquema del electrodo sensible a gas para CO_2 .

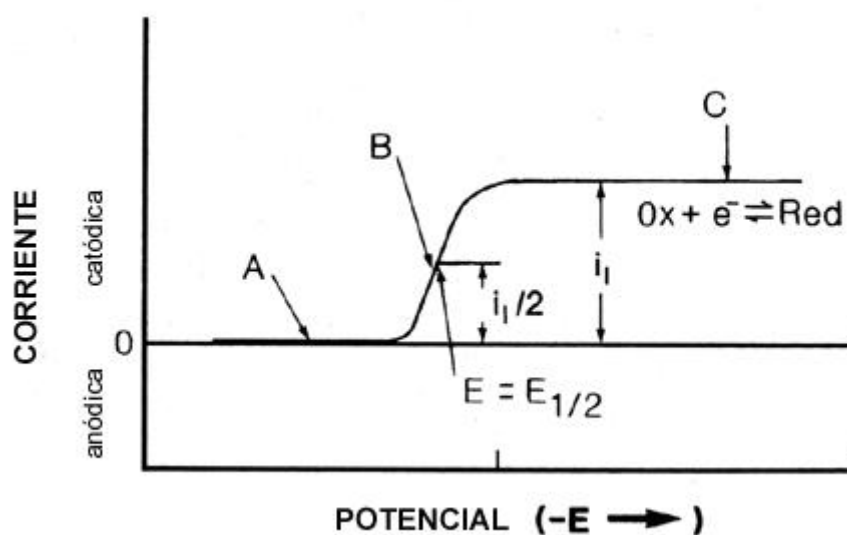


Figura 15-8 Voltamograma hidrodinámico general para la reducción de Ox a Red. El potencial es barrido negativamente de izquierda a derecha. i_l es la corriente limitante y $E_{1/2}$ es el potencial a la mitad de la onda.

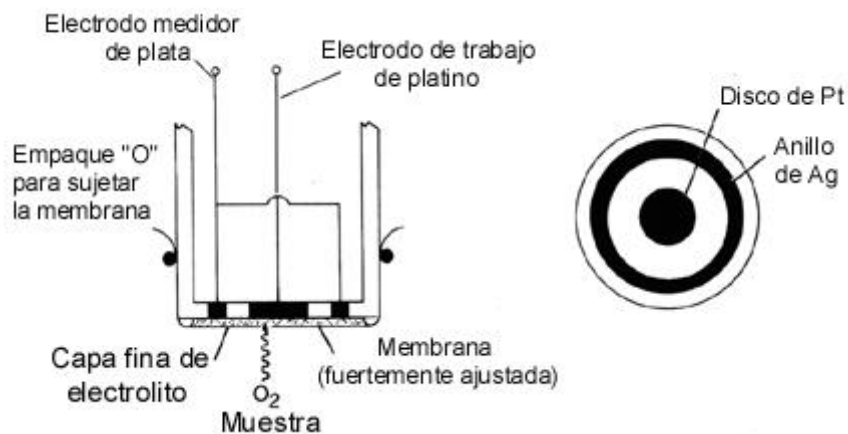


Figura 15-9 Esquema del electrodo de oxígeno. A, Vista transversal mostrando la difusión de O_2 de la muestra a través de la membrana. B, Ensamble del electrodo visto desde el fondo.

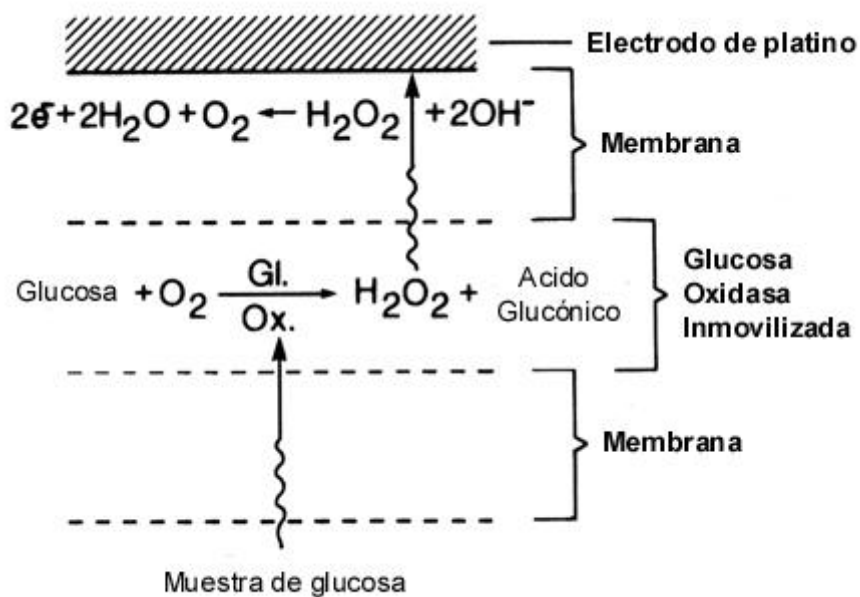


Figura 15-10 Esquema del electrodo de glucosa.



16. Automatización

Michael A. Pesce

Definiciones

Automatización de análisis químicos

Preparación e identificación de muestras

Preparación de reactivos

Proporciones de muestras y reactivos

Mezclado

Incubación

Detección

Computación

Datos impresos

Identificación de problemas y capacitación

Conceptos de automatización: definiciones

Repertorio de pruebas

Selectiva

Discreta

Flujo continuo

Analizador de lotes

Tiempo de estancia

Rendimiento

Pruebas de urgencias

Costos

Analizadores automatizados en química clínica

DuPont ACA IV, ACA Star, Dimension AR

Boehringer Mannheim Hitachi 747-200 y 911

Beckman Synchron CX-7 system

Eastman Kodak Ektachem 750 XRX

Miles Technicon RA2000, Chem-1, DAX

Baxter Paramax 720ZX

Analizadores de flujo centrífugo

Analizadores automatizados en inmunoquímica

Abbott TDx/FLx, IMx, AXSYM

Baxter Stratus Intellect

Tosoh ALA 1200

Behring Opus Plus

Boehringer Mannheim ES300

Sanofi Access

Diagnostic Products Corporation Immulite

Ciba-Corning ACS 180

SYVA Vista



Bio-Merieux Vidas Beckman Array 360 CE

Instrumentos para ser usados fuera del laboratorio hospitalario

Sistema de reactivos secos
Sistemas de química húmeda

Tendencias en la automatización

OBJETIVOS

- Delinear las etapas en el procesado de las muestras. Delinear los pasos del análisis y describir como éstos pueden ser adaptados para su automatización
- Describir las proporciones entre muestras y reactivos de acuerdo a como son realizados mediante los siguientes sistemas analíticos:
 - a. Sistema de reactivos de película seca
 - b. Analizadores discretos de pruebas
- Definir acarreo de muestras, identificando los sistemas donde es común verlo y sugerir al menos dos formas de por las cuales se pueda minimizar este fenómeno.
- Delinear el proceso de mezclado, incubación, y detección, así como describir como éstos son manejados en sistemas de película seca de reactivos, sistemas de flujo continuo y en analizadores discretos de pruebas.
- Enumerar e interpretar los ocho conceptos básicos de automatización, explicando como se aplican los conceptos a los analizadores automatizados comúnmente usados.

Términos clave

acarreo Contaminación de una muestra con la anterior.

análogo Una medida derivada directamente de la señal continua de un analizador (como el voltaje) y generalmente presentado en forma gráfica.

analizador de flujo centrífugo Usa la fuerza centrífuga para mezclar una alícuota de la muestra con el reactivo y para pasar la cubeta de reacción por un detector.

automatización Uso de maquinas designadas para realizar una secuencia predeterminada de operaciones individuales de manera repetida y automática.

códigos de barras Un sistema de reconocimiento de muestras por computadora que identifica tanto el especimen como los análisis que se van a realizar y transmite esta información a un analizador automatizado.

computación Cálculo de un resultado deseado desde la señal o registro de un analizador; ésta puede ser automatizada electrónicamente por medio de conversión digital o analógica.

datos Presentación escrita o en pantalla de los resultados de un análisis realizado en un instrumento.

digital Relacionado con los datos disponibles en la forma de unidades discretas o en los cálculos usando tales datos.

discreto Término aplicado a los analizadores que separan cada reacción de la muestra.

flujo continuo Analizadores que constantemente bombean reactivos y muestras a través de las mangueras y serpentines, formando una corriente continua.

incubación El tiempo que se deja pasar para que una reacción química se lleve a cabo.

instrumentos selectivos Instrumentos capaces de llevar a cabo varias pruebas en una muestra pero que lleva a cabo sólo aquellas que le fueron programadas.

inyección de flujo Colocación de una muestra dentro en la corriente de un analizador de flujo continuo.

menú de pruebas El número de pruebas que están disponibles en una situación determinada sin cambiar los reactivos o componentes en los analizadores.

mezclado Proceso por medio del cual los componentes de un ensayo químico son integrados en una solución homogénea.

proporciones la adición de componentes individuales a un ensayo químico en las cantidades y razones apropiadas.

reactivos a granel Aquellos que deben ser medidos antes de ser adicionados a la mezcla para alcanzar la proporción deseada. Generalmente un recipiente contiene los reactivos para más de un análisis.

reactivos por unidad de reacción Paquete de sustancias químicas premedidas para su reacción, de tal modo que un paquete (unidad) es usado para la prueba de una muestra.

rendimiento El máximo número de muestras individuales o análisis de pruebas que pueden ser realizados por hora por un sistema de ensayo, tomando en cuenta el tiempo de estancia.

repertorio de pruebas Todas las diferentes pruebas que están disponibles en un instrumento, incluidas aquellas que pueden realizarse cambiando los reactivos o componentes del instrumento.

sensor sistema o dispositivo que monitorea los cambios en la mezcla de reacción que están relacionados con la concentración del compuesto analizado.

tiempo de estancia El tiempo mínimo requerido para que un analizador obtenga un resultado, calculado a partir de la toma de la primera alícuota del espécimen.

volumen muerto El volumen de muestra que debe estar presente en el reservorio para una toma apropiada de alícuotas de la muestra pero que no es consumido.

Definiciones

En este capítulo se consideran las razones para la automatización y los caminos de llevarla a cabo. Se examinan también las mayores categorías de analizadores automatizados.

En esta sección el concepto de automatización es examinado en una perspectiva histórica. Es un hecho que se están realizando más pruebas por paciente cada año. Esto ha sucedido por muchas razones: el repertorio de pruebas disponibles se ha incrementado; más pacientes sobreviven enfermedades agudas y traumas, continuando así la necesidad de pruebas adicionales, y los resultados son generados más rápido y reportados a tiempo, para influir en las decisiones médicas. La necesidad de entrega de resultados a los médicos en el menor tiempo posible ha modificado el tipo de instrumentos disponibles para análisis, incluyendo los instrumentos que se usan en el lugar donde el paciente está hospitalizado.

Los incrementos en las cargas de trabajo han sido promovidos y sostenidos por mejoras en la productividad, algunas de las cuales han sido derivadas de la automatización. Un resultado relevante de la automatización ha sido el acceso casi ilimitado a los análisis de laboratorio por los médicos. Está todavía por determinarse el efecto positivo de este



fenómeno en la atención a los pacientes y en el costo del sistema de salud.

La automatización, en un hospital debe ser vista como un proceso industrial global abarcando la secuencia entera, que empieza cuando el médico solicita una prueba y termina cuando ese resultado es entregado al médico. Los laboratoristas deben estar conscientes en cada etapa del proceso ya que puede causar una falla en alguna etapa, resultando en un retraso en el tiempo de entrega de resultados o en la ubicación errónea de la muestra. El proceso general puede ser dividido en los siguientes componentes: solicitud de la prueba, adquisición de la muestra (flebotomía), transporte de la muestra, procesado de la muestra, análisis de la muestra, obtención de los resultados, y reporte de resultados.

En el Capítulo 3 puede encontrarse una discusión sobre la automatización de las primeras tres etapas y el uso de un Sistema de Información en el laboratorio (SIL) para automatizar las últimas tres etapas puede encontrarse en el Capítulo 18. Este capítulo revisa la automatización en las etapas de procesado y análisis de muestras.

La automatización, como se aplica al laboratorio de química clínica, puede ser definida como el movimiento propio o la transferencia mecánica de una muestra dentro de un ensamble de un complejo industrial, a una sucesión de maquinas trabajando por sí mismas, cada una de las cuales realiza una etapa específica en el proceso analítico total que va desde la muestra cruda hasta la producción del resultado analítico. Una segunda definición es la aplicación de procedimientos totalmente automatizados en el desempeño eficiente y control de las operaciones que involucran una secuencia de procesos estandarizados complejos o procesos repetitivos en gran escala. La automatización en el laboratorio puede ser considerada en el amplio contexto de la necesidad de obtener información acerca del estado de un paciente en un hospital o en un consultorio.

Una forma de visualizar como es transferida esta información se muestra en la Fig.16-1. Los pacientes son examinados por un médico y hay una decisión de obtener información específica del laboratorio. Una muestra es colectada, transferida, preparada, recibida, procesada y analizada por el laboratorio, para obtener los resultados deseados, que son entonces enviados de regreso al médico solicitante. En general, la automatización del laboratorio se ha enfocado en las etapas desde la recepción de muestras en el laboratorio hasta la transferencia de la información de regreso al médico solicitante. Hay, sin embargo, un creciente interés en los procesos de transferencia de muestras al laboratorio.

La automatización de la transferencia de muestras al laboratorio puede reducir algunos de los errores preanalíticos asociados con esta etapa (ver Capítulo 3) y reducir el tiempo total requerido para la producción de resultados. La transferencia de una muestra al laboratorio generalmente es realizada por medio de un sistema de tubos al vacío. Los tubos de flebotomía son colocados en un recipiente acolchonado el cual a su vez es colocado en una estación de envío. La estación de envío puede ser programada para trasladar el recipiente a una estación de recepción específica. El sistema de tubos al vacío puede transportar rápidamente (<5 minutos) muestras sin que éstas sufran significantes cambios fisiológicos como hemólisis, presencia de aire en las muestras para gases sanguíneos, obviando la necesidad del más lento y menos confiable transporte humano. La mayoría de los laboratorios se han concentrado en la compra de instrumentos para automatizar las etapas de análisis que son delineadas en la parte inferior de la Fig.16-1 y discutidas en detalle más adelante.

A pesar de que automatización implica el procesado de grandes cantidades de muestras, los principio inherentes a la automatización pueden también ser aplicado al análisis



de una sola muestra. Por ejemplo, un analizador de gases sanguíneos analiza una sola muestra a la vez pero generalmente es automatizado.

Las metas de la automatización en el laboratorio clínico son: (1) incrementar la flexibilidad y capacidad del laboratorio para expandir su menú de pruebas; (2) consolidar estaciones de trabajo; (3) hacer más eficiente el uso del personal y el espacio del laboratorio; (4) mejorar el tiempo de entrega de los resultados; (5) mejorar la precisión analítica de los resultados de las pruebas y minimizar los errores del laboratorio; (6) disminuir el costo general, incluyendo costo de reactivos, suministros, y personal; y (7) mejorar la transferencia de los resultados al médico solicitante. Con una planeación apropiada no hay razón por la cual estas metas no puedan ser alcanzadas.

Automatización de los Análisis Químicos

Para entender como son procesadas las muestras de los pacientes automáticamente, es necesario dividir el proceso de análisis en la forma en que se lleva a cabo en el ensayo manual, en una serie de pasos. Comúnmente el curso de un análisis consta de las siguientes etapas: (1) obtención de la muestra en la forma apropiada, (2) mezclado de una alícuota de la muestra con una serie de reactivos en una secuencia ordenada con cantidades definidas, (3) incubación de la mezcla de reacción a una temperatura específica por un tiempo determinado (4) monitoreo o detección de los resultados de la reacción, (5) cuantificación del grado de la reacción, y (6) proveer un reporte apropiado de los resultados en un registro permanente. La automatización puede ser aplicada a cualquiera de esas etapas. La automatización de estas etapas será discutida enseguida con cierto detalle

Preparación e identificación de la muestra

Hasta hace poco tiempo, se aplicaba rara vez la automatización en las etapas del procesamiento de muestras que ocurren antes del análisis. Por lo tanto grandes cantidades de muestras son etiquetadas manualmente, centrifugadas y divididas en alícuotas si han sido solicitadas pruebas en más de una estación de trabajo. La ejecución manual de estos procedimientos puede a menudo conducir a errores, los cuales generan resultados inexactos en las pruebas de los pacientes. Los errores en el etiquetado de muestras causan la transmisión errónea de la información del laboratorio. En forma similar, la necesidad de dividir la muestra en alícuotas para estaciones de trabajo separadas puede también conducir a una identificación inapropiada del paciente.

Se están intentando varias aproximaciones para evitar o minimizar estos pasos manuales del proceso. Coulter Olympus, Lab Interlink, y otros han introducido sistemas para automatizar los pasos del procesamiento inicial de las muestras del laboratorio. Estos sistemas emplean técnicas de robótica que han sido usadas en Japón durante la pasada década para desarrollar laboratorios altamente automatizados.

El sistema Coulter incluye estaciones modulares de preparación de muestras con guías de movimiento de muestras entre estaciones de trabajo. Estos sistemas automatizan la etapa de centrifugación, la división de la muestra en alícuotas (con códigos de barras), y el destaponado y retaponado de los tubos. Las etiquetas con códigos de barras son usadas para identificar muestras y solicitar pruebas. Después de su preparación, las muestras son automáticamente



transportadas a los analizadores apropiados para su análisis químico, hematológico, y uroanálisis o procedimientos de coagulación. El software para correr el sistema Coulter debe estar vinculado con el Sistema de Información del Laboratorio o SIL, término también conocido como LIS por sus siglas en Inglés.

El sistema Olympus está diseñado para analizar grupos de muestras, las cuales son entonces automáticamente conducidas al sistema Olympus AU-5000. El acarreador es una gradilla con capacidad para 10 muestras contenidas en tubos de 16 mm de diámetro. Cinco tubos secundarios pueden ser llenados del tubo primario y remitidos al laboratorio. El sistema es manejado por códigos de barras y requiere un Sistema de Información del Laboratorio para su control.

El sistema Lab Interlink es usado para automatizar el transporte de muestras dentro del hospital. Los rieles transportan las muestras de la estación de colección a las estaciones de trabajo analítico por una serie de carriles, los cuales pueden ser instalados por arriba o entre las localizaciones. Lectores de códigos de barras dirigen las muestras a diferentes localizaciones. El sistema Lab Interlink carece de estaciones de centrifugación y separado de muestras en alícuotas.

Debe haber espacio disponible en el laboratorio para instalar estos sistemas, y también debe contarse con técnicos e ingenieros biomédicos altamente calificados para apoyar la operación de los mismos.

Preparación de reactivos

Aunque se pueden preparar reactivos a granel en forma manual, casi todos los laboratorios usan concentrados o liofilizados. Por lo tanto solamente se requiere la dilución o reconstitución del reactivo con agua. Esta simple etapa, sin embargo, puede conducir a errores analíticos por dilución o procesamiento inadecuados. Estos errores pueden ser evitados adquiriendo reactivos para uso directo por el instrumento, sin necesidad de algún procesamiento. Los reactivos para una sola prueba han sido automatizados en dos formas. La primera en película seca o la técnica de papel impregnado con el reactivo deseado. La reacción analítica tiene lugar cuando la muestra es colocada en el reactivo seco (ver Johnson and Johnson Ektachem, Tabla 16-1 y pág. 302). En este tipo de reactivo, la preparación consiste en mojar el reactivo con agua, amortiguador, o la muestra. La segunda clase de reactivo por unidad de reacción viene en un tubo conteniendo líquidos o polvos a los cuales se les adiciona agua, amortiguador o la muestra. Debido a que los errores en la preparación de los reactivos son eliminados, este tipo de reactivos por unidad de reacción tiende a ser más reproducibles entre lotes siendo más consistente por un tiempo más largo. Sin embargo, los reactivos por unidad de reacción tienden a ser más caros que los reactivos a granel, representando una consideración económica de importancia para muchos laboratorios.

Proporciones de muestras y reactivos

La mayoría de las reacciones químicas requieren la combinación de reactivos y muestras en cantidades exactas para producir una, concentración final específica de compuestos analizados y reactivos. Ya que los reactivos, como se acaba de describir, son preparados en cantidades predeterminadas, la razón o proporción del reactivo debe mantenerse siempre constante para obtener concentraciones finales exactas y reproducibles del reactivo. Por consiguiente la adición de muestra al reactivo es llamada *dosificación proporcional*. El caso del reactivo por

unidad es considerado primero. En estos sistemas los reactivos son proporcionados en las cantidades requeridas; por lo tanto sólo la muestra debe ser adicionada de manera proporcional. El reactivo en película seca puede tener la muestra adicionada volumétricamente o por adición hasta saturación. Esta última técnica requiere de una explicación. La película es expuesta a un exceso de la muestra y los poros de la película permiten la absorción de una cantidad fija de la muestra. Esta cantidad requerida para humedecer la película representa el mecanismo de dosificación proporcional. En algunos casos de adición hasta saturación, la velocidad de difusión de la muestra en la película puede también afectar el paso del establecimiento de la proporción. En el caso de reactivos a granel las proporciones siempre se alcanzan por adición volumétrica. Hay tres métodos automáticos para dispensar volúmenes de uso común. Las jeringas o dispositivos volumétricos de rebosamiento son usados en analizadores discretos donde la muestra y los reactivos son adicionados volumétricamente a un tubo de prueba o a un recipiente. El segundo mecanismo es la técnica de flujo continuo usada cuando las muestras y los reactivos son alcanzan la proporción deseada a través de sus velocidades relativas de flujo. Característicamente, se usan bombas peristálticas para mover los reactivos a través de las mangueras, y la velocidad de flujo es controlada por el área transversal (diámetro) de las mangueras. Generalmente se deja que el caudal de muestras y reactivos fluya continuamente a través de las mangueras donde se llevan a cabo las etapas de mezclado e incubación. El tercer tipo usa válvulas eléctricas para controlar el tiempo de flujo de los reactivos. La velocidad de flujo es controlada aplicando aire a presión al recipiente del reactivo y a la resistencia al flujo en la tubería que está conectada al recipiente de reacción.

En casi todos los sistemas la muestra es introducida al analizador con una delgada sonda de acero inoxidable. Esta sonda entra a la muestra ya sea por penetración directa de un tapón o después que el tapón es retirado del tubo Vacutainer™, aspira una cantidad definida de la muestra y luego se mueve para dispensar la alícuota en un recipiente apropiado. Un problema potencial con estas sondas es el riesgo de coágulos; el cual está directamente relacionado con el tamaño de la muestra. A medida que la cantidad de muestra pipeteada decrece, el diámetro de la sonda decrece y el riesgo, de los coágulos se incrementa. Algunas sondas están diseñadas para detectar coágulos específicamente y rechaza las muestras coaguladas. Muchas sondas tienen adaptado un sensor de nivel que permite a la punta de la sonda bajar hasta un nivel específico para detectar cantidades escasas de muestra. Debido a que la misma sonda es usada repetidamente para muestras en secuencia, existe el riesgo potencial de contaminación de una muestra por la anterior. Esto es llamado acarreo de muestras. Varias técnicas han sido usadas para minimizar la interacción entre las muestras. Estas incluyen (1) aspiración de un líquido limpiador (como solución salina o agua) entre la aspiración de una muestra y otra, y (2) un enjuague en reversa de la sonda. En esta última técnica, el líquido limpiador fluye a través de la sonda en dirección opuesta a la de aspiración dentro de un recipiente de desechos. Este procedimiento tiene la ventaja de minimizar el riesgo de jalar un pequeño coágulo posteriormente dentro del sistema. Se puede determinar el grado de acarreo aspirando cuatro muestras idénticas de nivel alto inmediatamente seguidas por cuatro muestras idénticas de nivel bajo. El acarreo es calculado usando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de acarreo} = \frac{L1 - (L3 + L4)/2 \times 100}{L2}$$

$$\frac{(H3 + H2)}{2} - \frac{(L3 + L4)}{2}$$

donde $L1$, $L2$, $L3$ y $L4$ son las muestras consecutivas de baja concentración y $H1$, $H2$, $H3$ y $H4$ son las muestras consecutivas de alta concentración.

El acarreo afecta los resultados de las pruebas por contaminación de la muestra actual con una parte proporcional de la muestra anterior. La cantidad que se permita de contaminación debido al acarreo determinará el rendimiento. Si se permite menor acarreo, se debe dar un tiempo más largo para el enjuague después de la muestra anterior. Un tiempo más largo empleado en cada muestra reduce el número de muestras procesadas por hora.

Mezclado

Aquellos instrumentos que usan técnica de película seca mezclan muestra y reactivos por la difusión de la muestra en los reactivos. La mayoría de los reactivos de película seca son premezclados por el fabricante, aunque algunos son mezclados por difusión, la cual resulta posible sólo cuando la película es humedecida. Los analizadores discretos de pruebas pueden mezclar el reactivo y la muestra por (1) movimiento del tubo o recipiente, (2) agitación por una varilla o espátula, (3) agitación por burbujas de aire u ondas ultrasónicas, o (4) por convección que resulta de la adición forzada de la muestra en el recipiente.

Incubación

La incubación automatizada es meramente una demora en la estación donde la mezcla se deja reaccionar. En la mayoría de los casos, esto es realizado bajo condiciones específicas de temperatura, que es alcanzada por placas térmicas y baños de agua o aire. Estos dispositivos de temperatura constante son monitoreados electrónicamente por termopares. Los analizadores discretos realizan la incubación dejando que la mezcla repose en una cámara (tubo de ensayo o cubeta) por un tiempo especificado. Una aproximación similar es usada en los analizadores de película seca. Es importante tomar en cuenta que muchos métodos de pruebas requieren la adición de un segundo reactivo, posiblemente seguido de una incubación adicional. Los medios automatizados para hacer esto son similares a los que acabamos de discutir.

Sensores

Las técnicas de automatización no dependen del tipo de sensores que tengan, ya sean ópticos, térmicos, o eléctricos. Hay dos grandes clases de sensores automatizados; in situ y externos. La expresión "in situ" se refiere a la medición que se hace en el recipiente donde la reacción se está llevando a cabo, por ejemplo, la cubeta de reacción. El término externo es aplicado a los sistemas de medición donde las muestras son transferidas desde su posición original en el recipiente de reacción hasta el sensor. Las pruebas de película seca in situ por espectrofotometría de reflectancia (ver Capítulo 4) o por medio de electrodos integrales (electrométricos, ver Capítulo 15). Los instrumentos discretos de prueba usan ambos mecanismos de sensores, in situ y externos. Los sensores externos generalmente exponen la cámara del sensor a muchas muestras, por lo tanto es importante tomar medidas para eliminar el acarreo de una muestra a la siguiente. Las superficies ópticas o los electrodos también pueden estar contaminados por componentes de las muestras. Por otro lado, los sensores in



situ tienen especiales demandas en la cámara de prueba o requieren un elaborado procedimiento de lavado. Si el recipiente de la prueba es desechable, no resulta práctico calibrarlo para características ópticas o electrónicas. En consecuencia, estos recipientes deben ser fabricados para tener una buena reproducibilidad. Sin embargo, los recipientes desechables son fabricados para eliminar la complejidad mecánica que se requiere para lavar y recertificar la cámara de los sensores. La mayoría de las aplicaciones de detección se hace in situ porque este enfoque disminuye la complejidad mecánica del analizador.

Las reacciones químicas pueden ser monitoreadas ya sea en un punto en el tiempo o en muchos puntos. Comúnmente, se usa el monitoreo de un solo punto para el análisis de punto final en los cuales la reacción se ha realizado completamente. El monitoreo de múltiples puntos es usado para análisis cinéticos. Los analizadores discretos pueden ser fácilmente adaptados para el monitoreo de puntos múltiples.

Los analizadores espectrofotométricos a menudo tienen la capacidad de usar sensores automáticos para la detección de interferentes comunes como los que ocurren en presencia de ictericia, hemólisis, o lipemia. Un "índice" aproximado de las interferencias es reportado con los resultados de las pruebas. Esto ayuda a automatizar las revisiones que los técnicos hacen de los resultados y alertando al analista de que ese resultado puede no ser exacto (ver adelante).

Computación

La computación automatizada ha tenido dos formas: la analógica y la digital. La computación analógica usa las señales eléctricas como voltaje o corriente de un sensor (por ejemplo un fototubo) y cuantifica la señal comparándola con una señal de referencia. Por ejemplo un "blanco" de una mezcla de reacción debe dar 100% T (transmitancia del blanco), resultando en una cierta señal electrónica. Una prueba estándar puede dar un porcentaje de transmitancia más bajo y por consiguiente una señal electrónico reducida. La computación analógica compara las dos señales y toma el logaritmo del resultado. El resultado final está relacionado con la cuantificación de la reacción.

Algunas señales de reacción por su misma naturaleza están en forma de números discretos. Dos ejemplos son el conteo individual de fotones y el conteo de desintegración radioactiva. Esta señal, consiste en un número de eventos individuales que pueden ser monitoreados por una computadora digital que puede procesar la señal. El procesamiento digital está restringido a ciertas funciones aritméticas (tales como resta o suma) a menos que la computadora sea programable.

Algunas computadoras digitales necesitan un convertidor de analógico a digital para procesar las señales de muchos tipos de sensores en analizadores automatizados (tales como los espectrofotómetros, o electrodos selectivos de iones). Esto convierte el voltaje o señales de corriente a una forma digital, la cual puede ser procesada por la computadora digital.

No hay reglas directas sobre cual de las dos formas de computación es mejor. La decisión generalmente se basa en aspectos económicos. Sin embargo, si una parte del procesamiento de señales es hecha digitalmente, virtualmente todo el procesamiento es hecho en forma digital

Lectura y reporte de resultados

El método más simple que puede ser usado para visualizar el reporte de un analizador es el



uso de diodos emisores de luz, DEL, ("Light-Emitting Diodes o "LED", en inglés) o un monitor de televisión, TRC, ("Cathode-Ray Tube" o "CRT", en inglés) para expresar los datos en números. Estos dispositivos permiten al analista la revisión de los datos antes de aceptar los resultados. Algunos SILs y analizadores tienen la capacidad de hacer una "Revisión Automática de Datos." En este proceso, hay un criterio establecido para resultados de pacientes; si los resultados caen dentro de los criterios aceptados, los resultados son automáticamente validados e introducidos al expediente del paciente. El criterio para la validación automática de datos puede incluir resultados que caen dentro de un especificado intervalo (intervalo de referencia), la ausencia de interferentes comunes (ver anteriormente), y revisiones delta. El proceso acelera la validación de los resultados de rutina y permite al analista realizar una revisión más cuidadosa de los resultados con problemas potenciales.

El reporte de estos analizadores es generalmente convertido a una copia (copia dura) impresa en papel. Los datos deben ser transferidos manualmente en hojas del laboratorio o en registros permanentes. Esta etapa manual, por supuesto, es objeto de errores de transcripción.

Sistemas más sofisticados, de computación automatizada, cotejan todos los resultados de las pruebas en cada paciente, e imprimen los resultados directamente en la forma de reporte. Cuando los resultados son transferidos a una computadora del laboratorio, el reporte del analizador pueden ser conectado directamente a la computadora. Aunque son posibles las conexiones analógicas, la mayoría de las conexiones son digitales. En el Capítulo 18 se discute el uso de computadoras en interfase para la automatización del proceso del reporte de resultados.

Generalmente hay un retraso entre el tiempo en que un resultado es suministrado al SIL y está disponible para el médico y el tiempo cuando el médico realmente ve los resultados. Este retraso ocurre porque un médico nunca sabe exactamente cuando estará disponible un resultado y debe, ya sea perder tiempo buscando resultados que todavía no están en el SIL o tardarse en ver los resultados que ya están listos. Este retraso es un gran componente del tiempo total del tiempo de retorno, TR, ("Turnaround Time" o TAT, en inglés) de una muestra. Hay sistemas mejorados de localizadores electrónicos (pagers) para hospitales que permiten al laboratorio usar el SIL, para enviar el resultado directamente al localizador electrónico del médico. Tan pronto como el analista verifica el resultado en el SIL, éste es transmitido al localizador (pager).

La identificación del paciente y el resultado de la prueba, así como textos breves pueden ser desplegados en la pantalla del localizador. Los datos automatizados transferidos directamente al médico, disminuyen el tiempo de entrega de resultados, especialmente en el caso del reporte de resultados con "valores críticos".

Localización de fallas y capacitación

Los técnicos intervienen en la corrección de problemas encontrados cuando un analizador falla (ver pág. 394). Este proceso es llamado "localización de averías" está limitada por el entrenamiento del analista y la habilidad de los recursos internos del laboratorio como los manuales del instrumento. Estos recursos han sido expandidos sustancialmente por la aplicación de tecnología electrónica, tales como modems on-line y CD-ROMs.

Los modems permiten que la información electrónica sea transferida en forma rápida sobre líneas telefónicas normales. Las computadoras sofisticadas que forman parte de los nuevos analizadores de laboratorio pueden detectar los problemas en el analizador, antes de



que el analista los note y automáticamente transmite datos sobre el problema al fabricante del analizador.

Los CD-ROMs pueden proveer el mismo servicio dentro del laboratorio. Los CD-ROMs multimedios pueden contener sofisticados manuales electrónicos de localización de fallas. Una vez que el problema ha sido detectado por la computadora, ésta alertará al analista y le indicará donde encontrar la información para corregir el problema. Si es necesaria ayuda adicional, pueden estar disponibles algunos videos dentro de la base de datos del CD-ROM sobre como reparar una avería.

La guía electrónica de localización de averías y sus guías en videos que la acompañan pueden también ser usadas para entrenar a los analistas en el uso del instrumento.

Conceptos de Automatización: Definiciones

Repertorio de pruebas

Las prioridades económicas requieren que los analizadores realicen más de una clase de prueba. Una vez que se ha invertido en un analizador automatizado, es necesario incrementar el número de pruebas realizadas en cada muestra para reducir el costo y la mano de obra requeridas para producir cada resultado. Siguiendo esta lógica al extremo pudiera requerirse que un analizador sea capaz de realizar cada tipo de prueba concebible. Esto no ha sido posible. Sin embargo, 6 pruebas químicas son responsables del 50% de la carga de trabajo promedio en el laboratorio de química, y otro 40% de la carga total de trabajo se atribuye a 14 pruebas. Hasta ahora los analizadores automatizados han sido diseñados para realizar la mayoría de las pruebas más frecuentemente ordenadas. Aunque la automatización de las pruebas que se ordenan rara vez no es esencial, es también deseable. La automatización de las pruebas puede ser hecha con base al análisis más que en el volumen de pruebas (número de muestras); es decir que un analizador automatizado para inmunoensayos realizará inmunoensayos para muchos diferentes compuestos independientemente del número de especímenes por análisis

El *repertorio inmediato de pruebas* de un analizador puede, por lo tanto, ser definido como el número de pruebas que realiza un analizador en cualquier momento dado, mientras que el *repertorio total de pruebas* incluye el número total de las diferentes pruebas que posiblemente puede realizar el analizador (esto es, con el cambio de reactivos y unos cuantos componentes). Las mejorías en las técnicas y los cambios en las prioridades económicas han conducido a un nuevo fenómeno llamado *consolidación en el sitio de trabajo*. Este fenómeno involucra el incremento del repertorio inmediato de pruebas de analizadores de acceso al azar (ver adelante) y tiene muchas pruebas de alto volumen en el menor número de analizadores.

La posibilidad de realizar inmunoensayos automatizados en los tradicionales analizadores químicos automatizados, ha estimulado adicionalmente este movimiento.

Selectivo

Los analizadores que son capaces de realizar pruebas múltiples, son selectivos si la realización de una prueba particular en una muestra individual puede ser especificada y si ninguna muestra o reactivo son consumidas por pruebas que no son requeridas. Por ejemplo, el SMAC fue un instrumento no selectivo porque todas las pruebas en el repertorio inmediato fueron realizadas en cada muestra, independientemente de que las pruebas exactas fueran solicitadas. Un



anализador discreto como el ACA, realiza sólo las pruebas solicitadas.

Los analizadores selectivos también han sido analizadores de *acceso al azar* por su capacidad para procesar diferentes combinaciones de pruebas para muestras individuales.

Discreto

Los analizadores que compartimentalizan cada reacción de la muestra son analizadores discretos. Característicamente la alícuota de la muestra y el reactivo están contenidos en una sola cubeta que está físicamente separada de otras cubetas. La mayoría de los instrumentos actuales son analizadores discretos.

Flujo continuo

Los instrumentos que bombean continuamente reactivo a través de las mangueras y serpentines para formar una corriente y que continuamente bombean la muestra dentro de la corriente son llamados analizadores de flujo continuo

El paso de preparar la proporción de muestras y reactivos es realizado mediante el control de las respectivas velocidades del flujo volumétrico.

Analizadores de lotes

Los instrumentos que realizan la misma prueba simultáneamente en todas las muestras que se le presentan son llamados analizadores de lotes. El tipo de prueba puede variar ampliamente, pero generalmente sólo un número limitado de muestras es procesado por análisis.

Tiempo de estancia

El tiempo de estancia es el mínimo tiempo requerido para obtener un resultado después de la preparación inicial de alícuotas de la muestra. Algunos instrumentos pueden dar resultados en un tiempo tan corto como 15 segundos para una sola prueba como la de glucosa.

Comúnmente, los instrumentos que realizan pruebas múltiples en una sola muestra tienen tiempos más largos de estancia, abarcando desde 60 segundos hasta 15 minutos. Ciertos procedimientos de pruebas, tales como el análisis cinético de actividad enzimática o radioinmunoensayos, que requieren largas incubaciones tendrán, por supuesto, tiempos más largos de estancia. El tiempo de estancia es extremadamente importante cuando ocurren rápidamente cambios fisiológicos o cambios que ponen en riesgo la vida del paciente. Por lo tanto, las determinaciones de gases sanguíneos (pH, P_{CO_2} , y P_{O_2}) necesitan instrumentos con tiempos de estancia del orden de segundos. Por otro lado, un "tiempo de estancia" de varios días para ensayos de vitaminas puede ser clínicamente aceptable.

Rendimiento

El rendimiento es el máximo número de muestras o pruebas que puede ser procesado en una hora. Para analizadores similares es posible calcular el rendimiento total de pruebas multiplicando el número de pruebas procesadas por hora por el número de pruebas realizadas en cada muestra. Para analizadores discretos, el rendimiento de muestras dependerá obviamente del número de las diferentes pruebas requeridas en cada muestra. Además, el tiempo requerido por prueba puede variar ampliamente (desde menos de 30 segundos hasta más de 10 minutos). En general, entre más pruebas sean ordenadas por muestra, más lento es el rendimiento de muestras en un analizador discreto. Por consiguiente es más difícil dar un



valor simple y exacto para el rendimiento de pruebas en un analizador discreto. Los cálculos para rendimiento no toman en cuenta el tiempo de estancia; esto es, el hecho de no estar produciendo resultados hasta que el tiempo de estancia haya transcurrido. El rendimiento deseado de un instrumento, generalmente corresponde con el número de muestras que necesitan ser procesadas en un período dado de tiempo. Por ejemplo, un instrumento con rendimiento más alto (y más costoso) puede ser requerido para procesar muestras de una clínica para que los resultados estén disponibles antes de que el paciente regrese a su casa. En general un analizador automatizado es escogido con base en su capacidad para procesar el volumen de la carga de trabajo rutinaria a tiempo de hacer las decisiones clínicas de rutina.

Pruebas de urgencia

Las pruebas de urgencia representan una gran parte de la carga de trabajo del laboratorio (entre 30% y 50% de muchos laboratorios). Las pruebas urgentes deben analizarse antes que las pruebas de rutina, esto causa la interrupción del flujo normal de trabajo en el laboratorio. Desafortunadamente, muchas solicitudes urgentes no son ordenadas por una emergencia médica.

Para cada prueba urgente debe ser definido el tiempo de entrega de resultados, TER, (término que se conoce también como TAT por sus siglas en inglés) a partir de la recepción de la muestra en el laboratorio) aceptable dentro del laboratorio, normalmente después de consultar con el personal médico. La CLIA'88 requiere de la capacidad de cada laboratorio para lograr el monitoreo rutinario de los TERs. Los TERs generalmente se mantienen bien dentro de 60 minutos para la mayoría de las pruebas de urgencia, pero pueden ser mayores para pruebas que se necesitan rápido pero no inmediatamente (ver pág. 61). Hay también instrumentos disponibles para la realización de pruebas de urgencias en el lugar donde el paciente está siendo atendido. Estos dispositivos pueden ser usados para mejorar los TERs en áreas críticas del hospital (ver adelante y Capítulo 2). Una prueba super urgente que tiene un TER menor de 10 minutos, puede ser obtenido por el uso de muestras de sangre total para medición de gases sanguíneos, glucosa, urea, nitrógeno, lactato, hematocrito y electrolitos.

Los instrumentos que son usados para pruebas de urgencia no necesitan tener un alto rendimiento pero deben tener un corto tiempo de estancia. Muchos instrumentos de urgencias están dedicados a analizar no más de media docena de pruebas de alta frecuencia en forma simultánea.

Costos

Los recursos consumidos en la producción de resultados de pruebas de pacientes representan el costo de esa prueba. El costo incluye mano de obra (la cual es la representación monetaria del tiempo gastado en procesar y analizar la muestra), mantenimiento del instrumento, contrato de servicios, reactivos (los cuales son calculados por costo de las sustancias químicas usadas para la prueba y una parte proporcional de aquellos requeridos para preparar el instrumento), calibración y control de calidad, consumibles (consta del costo de recipientes de las muestras, papel), y costo de capital, el cual es una cantidad proporcional de la vida del instrumento consumida y de los gastos generales del hospital incluyendo el costo de partidas tales como papelería y mantenimiento del laboratorio.

Analizadores Automatizados en Química Clínica



Esta sección describe un número de analizadores que son usados para pruebas químicas de rutina en el laboratorio de un hospital. La Tabla 16-1 muestra una comparación de los parámetros operacionales de algunos analizadores automatizados. Obviamente, esta tabla no incluye todo pero si muestra las características disponibles de los tipos comunes de analizadores.

DuPont ACA IV, ACA STAR, Dimension AR

ACA IV, ACA STAR.

El ACA V (Du Pont, Wilmington, Delaware) es un analizador discreto y selectivo que puede servir como un analizador de química general en hospitales pequeños y como un analizador especializado en hospitales medianos. Las muestras para el ACA pueden ser suero, plasma, orina, o líquido cefalorraquídeo. Los reactivos vienen empacados en paquetes de plástico los cuales también sirven como cubetas de reacción.

Una sonda aspira la muestra y el amortiguador y los dispensa en la entrada del paquete de la prueba. Para algunos ensayos, el compuesto analizado es parcialmente purificado cuando la muestra es pasada a través de una columna antes de llegar al paquete de prueba. Los reactivos, aislados en compartimentos separados del paquete, son liberados y mezclados con la muestra y el amortiguador. Las mediciones fotométricas son llevadas a cabo cuando el paquete de plástico es preparado en una cubeta de 1 cm de longitud de trayectoria. Los métodos de punto final son medidos bicromáticamente, excepto por varios métodos que usan dos paquetes para permitir la medición de un blanco de absorbancia a la longitud de onda deseada. Los métodos de velocidad (cinéticos) y los métodos enzimáticos son medidos a una sola longitud de onda por un intervalo de 15 segundos. El ACA requiere poca interacción del operador y es apropiado para turnos extras.

El ACA Star contiene varias características que no están disponibles en el ACA V. El rendimiento del ACA Star es significativamente incrementado hasta 90 pruebas por hora. Están disponibles en el ACA Star el tubo primario de muestreo, identificación de muestras por códigos de barras, capacidad de detección del nivel del líquido, almacenamiento de curva de calibración de dos diferentes lotes de reactivos, interfase del SIL bidireccional, y un detallado sistema de control de calidad y manejo del paciente. El ACA Star usa la misma metodología que el ACA V.

Dimensión.

El Dimension es un analizador que puede ser colocado directamente en el piso y es usado para pruebas de rutina, pruebas de perfiles, o pruebas de urgencia. El Dimension tiene dos compartimentos para muestras, cada uno de los cuales tiene capacidad hasta para 60 muestras. Las muestras se aspiran ya sea de las copas con códigos de barras o del tubo primario de colección. Las muestras de urgencia pueden ser introducidas en cualquier momento y son procesadas antes que las muestras de rutina.

Los reactivos están liofilizados y empacados en cartuchos de multiwell Flex, que son colocados en compartimentos refrigerados del analizador. Se pueden colocar 45 cartuchos en el analizador. Cada cartucho Flex tiene códigos de barras y tales códigos permiten al Dimension monitorear el inventario de reactivos y dar seguimiento a las fechas de expiración. Una característica única del Dimension es que los reactivos en cada compartimento son



hidratados conforme se van necesitando. Por ejemplo, si un cartucho contiene 240 pruebas con 40 pruebas en cada uno de los compartimentos, el analizador reconstituirá solo el reactivo necesario para realizar los ensayos requeridos. Esta característica extiende la estabilidad de la calibración y decrece el gasto de reactivos. Du Pont provee cartuchos vacíos para análisis químicos definidos por el usuario.

La reacción química tiene lugar en cubetas pequeñas, limpias y desechables que son fabricadas dentro del analizador con película Surllyn Resin. El Dimension puede contener suficiente película para 1200 cubetas. Las muestras serán automáticamente diluidas y corridas nuevamente si la linealidad del método es rebasada.

Boehringer Mannheim Hitachi 747-200, 911 Systems

Hitachi 747-200.

The Hitachi 747-200 es un analizador de alto rendimiento que es usado para perfiles de rutina y para paneles de pruebas químicas. El 747 alcanza su alto rendimiento por la aspiración de muestras para 4 diferentes ensayos simultáneamente durante un período de 6 segundos. Las muestras son pipeteadas de los tubos primarios de muestra o de las copas con códigos de barras, por dispensadores de desplazamiento positivo. La sonda baja a la profundidad suficiente en la muestra para evitar la aspiración de burbujas y al mismo tiempo actúa como sensor de detección de nivel del líquido. Las muestras de urgencias son colocadas en gradillas rojas que son cargadas en un área especial. El analizador detecta la gradilla de urgencias y le da prioridad. Generalmente el primer resultado de urgencias está disponible entre 12 y 20 minutos, dependiendo del número de pruebas que se estén corriendo en la gradilla adelante de ésta.

Dos reactivos están disponibles para 32 pruebas y son almacenados en el compartimento refrigerado del analizador. Después de que la muestra ha sido inyectada en la celda de reacción, el primer reactivo es adicionado. Entonces la celda se mueve hacia la posición donde los agitadores son colocados dentro del líquido para mezclar la solución. Después de que el segundo reactivo es adicionado e incubado, la intensidad del color es determinada por el fotómetro. Las muestras son corridas nuevamente en forma automática cuando la linealidad del ensayo es rebasada o cuando el criterio definido por el laboratorio no es alcanzado. El analizador imprime "índices de suero", los cuales pueden ser usados por el analista para valorar el grado de interferencia por lipemia, hemólisis, o ictericia.

Hitachi 911

El Hitachi 911 es un analizador que puede ser colocado directamente en el piso y consiste en un carrusel para muestras, dos carruseles de reactivos cada uno conteniendo 32 recipientes de reactivos y un disco de reacción con 120 cubetas reusables. Las muestras pueden ser pipeteadas cada 10 segundos desde las copas o tubos primarios de colección. Los volúmenes insuficientes de muestras son detectados por un sensor del nivel de líquidos. Las muestras tienen códigos de barras para una identificación positiva del paciente, y los resultados de urgencias para la mayoría de las químicas están disponibles en menos de cinco minutos. Los reactivos tienen de códigos de barras y colocados en el compartimento refrigerado del analizador. La característica única del 911 es la habilidad de adicionar múltiples reactivos por método. Los recipientes vacíos de reactivos pueden ser obtenidos de Boehringer-Mannheim



para aplicaciones definidas del usuario. El 911 tiene capacidad para hacer autodiluciones de muestras de suero y orina así como las características de correr nuevamente una prueba y autocalibrarse en forma automática.

Beckman CX7 Synchron Analyzer

El CX7 es una combinación de los módulos CX3 y CX4 CE. Generalmente el CX3 se dedica a muestras de urgencias. El CX4CE es un módulo fotométrico que usa lecturas fotométricas bicromáticas y policromáticas para reacciones de punto final, cinéticas o turbidimétricas. Las muestras con códigos de barras son colocadas en sectores que pueden acomodar tubos primarios de sangre o copas de muestras. Cada sector puede contener 7 muestras. Seis sectores pueden ser transferidos al carrusel de muestras y tres sectores pueden colocarse dentro del cargador automáticamente, permitiendo que 63 muestras sean procesadas al mismo tiempo. La característica única del sistema CX7 es que el tubo primario de muestra puede ser colocado en sectores, centrifugado en la centrífuga Beckman, y subsecuentemente colocados en el analizador CX7. Esto minimiza el manejo de los especímenes y proporciona al laboratorio de un flujo de trabajo más eficiente.

El compartimento de reactivos del analizador es refrigerado y provee almacenamiento para 24 cartuchos de reactivo identificados por códigos de barras. Una verificación del inventario de reactivos es realizada después de cargar los reactivos. La mayoría de los reactivos están listos para ser usados y cada cartucho tiene compartimentos para 3 reactivos. Debido a que puede ser colocado más de un cartucho de la misma química en el carrusel de reactivos, el instrumento usará automáticamente el segundo cartucho después de que el primero se haya consumido. El CX7 es un sistema abierto y Beckman provee cartuchos vacíos para químicas definidas por el usuario. Las muestras urgentes son automáticamente procesadas antes que las de rutina y los resultados generalmente están disponibles en menos de 5 minutos.

Johnson and Johnson Ektachem 750 XRC

El Ektachem 750 XRC usa la tecnología de película seca de multicapas en laminilla. La laminilla está compuesta de capas, algunas de las cuales sirven para ultrafiltrar la muestra (eliminación de proteínas) mientras que otras sirven para proveer reactivos activados. La adición de muestras de suero proporciona el solvente necesario para rehidratar los reactivos secos. Los productos de la reacción colorida son medidos por reflectancia en el lado opuesto al usado para la adición de la muestra. La luz reflejada es convertida a unidades de concentración (de los productos de reacción) por la formula Williams-Clapper (análoga a la ley de Beer) para convertir luz transmitida a unidades de absorbancia (ver Capítulo 4 pág. 94).

Las muestras pueden ser pipeteadas de los tubos primarios de colección o de las copas de muestras con código de barras. Las laminillas son automáticamente dispensadas de los cartuchos de prueba para el compuesto analizado específico. El analizador puede almacenar sesenta cartuchos con códigos de barras cada uno conteniendo 50 laminillas con capacidad para 300 pruebas. Las laminillas son incubadas a 37° C cuando se trata de ensayos colorimétricos y a 25° C si se trata de ensayos potenciométricos. Después de completar el ensayo las laminillas son depositadas en recipientes desechables.

Bayer (Technicon) RA-2000, Chem-1, DAX



RA-2000.

Para dispensar muestras y reactivos el RA-2000 usa sondas separadas, los lados interno y externo de la sonda están cubiertos con fluorocarbono. Esto evita el contacto de la muestra con las paredes de la sonda. La muestra es aspirada dentro de la sonda junto con una burbuja de aire y una solución de fluorocarbono que cubre completamente la punta de la sonda. La muestra junto con el fluorocarbono es dispensada en una cubeta desechable. Debido a que el fluorocarbono es más denso, éste se asentará en el fondo de la cubeta, y no afectará las mediciones fotométricas. El material de fluorocarbono provee de una superficie inerte que evita el acarreamiento entre muestras o entre reactivos. Las reacciones en las cubetas (a 30° o 37° C) son monitoreadas fotométricamente. El RA-2000 puede determinar pruebas químicas por tiempo final, tiempo fijo, o cinéticas. Hay disponibles electrodos selectivos de iones para la medición de electrólitos.

Chem-1.

El Chem-1 es un analizador con sistema de flujo continuo en el cual se genera una cápsula para la realización de cada prueba y la reacción ocurre en un tubo de teflón. Una cápsula consiste de una muestra y un reactivo separados de otro reactivo por una pequeña burbuja de aire. Esta cápsula es transportada a través de un tubo de teflón, las muestras y reactivos son mezclados, y la absorbancia es medida en una serie de estaciones ópticas. La introducción del fluorocarbono inerte dentro del tubo de teflón provee una interfase entre la muestra y la burbuja de aire y permite a la burbuja de aire moverse sobre la capa de fluorocarbono, evitando que la muestra y los reactivos toquen las paredes del tubo y de esta manera elimina el acarreo. Para el Chem-1 no hay cubetas desechables o reusables.

Los reactivos en cassettes con códigos de barras son colocados en el compartimento refrigerado del analizador que contiene cassettes para 32 reactivos. Los reactivos son automáticamente activados y tiene 30 días de estabilidad en línea. Pueden ser cargados varios cassettes del mismo reactivo en el analizador.

El Chem-1 puede contener 272 muestras, las cuales pueden ser aspiradas desde un tubo primario de colección o una copa de muestra. La novedosa característica del Chem-1 es el pequeño volumen de muestras y reactivos que se usan para cada ensayo. Los ensayos fotométricos requieren 10 µL de muestra y 140 µL de solución amortiguadora.

DAX.

La característica singular del DAX es que se pueden procesar un número fijo de muestras por hora, independientemente del número de pruebas ordenadas en esas muestras. Por ejemplo, con el DAX48, son procesadas 150 muestras por hora.

Las muestras son cargadas en una placa que sostiene 60 gradillas de muestras. Cada gradilla tiene 5 espacios para tubos de muestras. Las muestras son identificadas por códigos de barras y aspiradas de un tubo primario de colección o de una copa de muestra. El sensor del nivel de líquido detecta volúmenes inadecuados de muestras y burbujas. Las muestras urgentes son procesadas antes que las de rutina.

El compartimento de reactivo tiene espacio para 12 reactivos a temperatura ambiente y para 36 reactivos entre 2° C y 8° C. Dependiendo del ensayo, los reactivos pueden estar listos para ser usados o liofilizados. Las muestras y los reactivos son dispensados en una cubeta

reusable en la plataforma de reacción la cual contiene 96 lugares de 4 cubetas para un total de 384 cubetas. Los índices de sueros impresos permiten al analista la valoración del grado de lipemia, hemólisis, e ictericia de cada muestra. Un resultado de una prueba que excede la linealidad se corre nuevamente con un factor de dilución preestablecido.

Baxter Paramax 720ZX

La característica única del Paramax 720ZX es la tecnología de reactivo seco. Los reactivos están empaquetados en dispensadores de 100 o 300 tabletas y son colocados en un carrusel con 48 posiciones. Las tabletas de reactivos son automáticamente reconstituidas en la medida que se van necesitando, lo cual aumenta la estabilidad de la curva de calibración hasta 90 días para la mayoría de los ensayos. Para cada prueba, puede ser almacenada una curva de calibración para 5 diferentes lotes de reactivo. El instrumento usa cubetas de reacción desechables empacadas en carretes de 2100 cubetas. Ya que las cubetas son usadas una sola vez, no hay contaminación cruzada en las mezclas de reacción, y se elimina la necesidad de complicados sistemas para el lavado de cubetas.

Las muestras son provistas de códigos de barras y colocadas en un carrusel que puede contener hasta 96 muestras. Este instrumento también puede tomar muestras de tubos tapados. De este modo el personal del laboratorio no tiene que destapar los tubos, eliminando la posibilidad de salpicado de fluidos biológicos y el problema de volver a sellar los tubos al final del proceso.

Cuando una prueba es ordenada en el analizador, una tableta del reactivo es dispensada en la cubeta. El diluyente es adicionado y la cubeta es sumergida en un baño de agua a 37° C. La tableta es disuelta en 45 segundos por un dispositivo de ultrasonido de alta eficiencia, entonces es medido un blanco de reactivo, y luego se adiciona la muestra. Las muestras urgentes pueden ser cargadas en cualquier momento. Debido a que la muestra debe esperar que sean procesadas las 5 muestras precedentes, el tiempo de entrega de resultados para una prueba urgente puede variar de 5 hasta 20 minutos. Cuando el análisis es completado, la parte superior de las cubetas es sellada por calor y éstas son depositadas en un recipiente de desechos.

Analizadores de flujo centrífugo

El elemento clave en un analizador de flujo centrífugo es el rotor. Las muestras y los reactivos son pipeteados en compartimentos discretos y mezclados juntos, primero por la acción de una fuerza centrífuga cuando el rotor es acelerado, desacelerado, y acelerado nuevamente lo cual mezcla la solución por agitación. Las cubetas pasan por una fuente estacionaria de luz para permitir lecturas de absorbancia a una longitud de onda previamente determinada. Estos analizadores son útiles para medición de velocidades de reacción (cinéticas) o para análisis de punto final.

La flexibilidad de estos instrumentos permite una fácil adaptación de reactivos "en casa", y el uso de reactivos a granel de una gran variedad de proveedores. El consumo de reactivos es pequeño, característica que los hace económicos. Algunos instrumentos usan las cubetas del rotor desechable mientras que otros lavan el rotor para usarlo nuevamente. Los analizadores con centrífuga pueden realizar análisis fotométricos, turbidimétricos, nefelométricos, y fluorométricos. A pesar de que en teoría, el rendimiento de la prueba puede ser alto, en la práctica resulta considerablemente más bajo debido a las corridas subsecuentes



que con frecuencia son requeridas para volver a analizar las muestras que dan resultados insatisfactorios, como el exceso de actividad enzimática.

Analizadores Automatizados para Análisis Inmunoquímicos

El número de sistemas para análisis inmunoquímicos disponibles para uso en el laboratorio clínico se ha incrementado enormemente en los últimos años, y el director del laboratorio tiene ahora la envidiable situación de poder seleccionar el sistema óptimo para su laboratorio. El sistema para análisis inmunoquímicos que mejor cubra las necesidades del laboratorio depende del tamaño y carga de trabajo del laboratorio. Otros aspectos a considerar cuando se escoge un sistema de pruebas inmunoquímicas son: menú de pruebas, tiempo de entrega de resultados, rendimiento, grado de automatización, sistema de manejo de datos, y costo. En las Tablas 16-2 y 16-3 se muestra una comparación de las características operacionales de algunos sistemas de análisis inmunoquímicos.

Abbott TDx, FLx, IMx, AXSYM

TDx.

El sistema TDx fue en un principio diseñado para uso en medición de fármacos terapéuticos por inmunoensayo fluorescente de polarización (ver Capítulo 4 pág. 100). El sistema TDx también puede realizar algunos análisis químicos no relacionados con medicamentos (como glucosa, lactato y creatinina) mediante el procedimiento de atenuación de la radiación y puede medir proteínas específicas por análisis nefelométrico con un carrusel especialmente diseñado que contiene la fuente de luz. El sistema TDx tiene dosis de unidades de reactivos para medir proteínas específicas y algunos ensayos de drogas. El TDx también está disponible como el FLx, el cual tiene cierta capacidad de acceso al azar.

Imx.

El IMx es un analizador de mesa que usa tecnología para inmunoensayos enzimáticos con micropartículas de látex para medir compuestos de alto peso molecular y tecnología de polarización de fluorescencia para medir hormonas y compuestos terapéuticos. El IMx consiste en; una cámara de reacción, compartimento de reactivos y una plataforma de control. Un carrusel de 24 lugares es colocado en la cámara de reactivos. Las celdas de reacción que contienen matriz de fibra de vidrio, la muestra, y los recipientes para incubación son colocados en el carrusel. Las muestras son manualmente dispensadas por el operador en un recipiente para muestras. La muestra junto con los anticuerpos cubiertos con látex son pipeteados en un recipiente de incubación e incubados a 34° C para formar el complejo inmune. Una alícuota del complejo inmune es transferida a la matriz de fibra de vidrio donde es unido en forma irreversible a la matriz. Después de que la fibra de vidrio es lavada, se adiciona un conjugado de fosfatasa alcalina y luego se permite que la reacción proceda. La fluorescencia del producto es medida y relacionada con la concentración del compuesto analizado. A pesar de que el sistema IMx es esencialmente un analizador de lotes, existe un carrusel de reacción selecta que permite al operador correr tres análisis químicos por muestra.

AXSYM.

El AXSYM es un analizador con acceso al azar que combina las tecnologías de polarización

de fluorescencia y de inmunoensayos enzimáticos en un solo sistema automatizado. El analizador está dividido en dos centros; el de muestreo y el de procesado. El centro de procesado contiene tres carruseles concéntricos, uno para muestras, otro para reactivos y un tercero para recipientes de reacción. Los especímenes pueden ser pipeteados ya sea del tubo primario de colección o de copas de muestras. En el rotor de muestras son colocados 60 tubos primarios de muestra con códigos de barras o 90 copas de muestras. Veinte cartuchos de reactivos con códigos de barras para 100 pruebas son colocados en el compartimento para reactivos. Los reactivos son mezclados por agitación durante 3 minutos cada 8 horas o cuando un nuevo reactivo es colocado en la plataforma. Los recipientes de reacción en tiras de 10 son colocados en el carril de las muestras. Cada recipiente de reacción contiene una cubeta de plástico y varios lugares para reactivos. Muestras y reactivos son pipeteados en un recipiente separado de los vasos de reacción cada 30 segundos. Una muestra urgente es procesada tan pronto como la secuencia de pipeteo para el ensayo de rutina esté completa. Después de que las muestras y reactivos son pipeteadas, los vasos de reacción son transferidos al centro de procesamiento del AXSYM. El centro de procesamiento tiene la temperatura controlada a 34° C y tiene una lámpara de tungsteno-halógeno para ensayos de polarización de fluorescencia y una lámpara de baja presión de mercurio para los inmunoensayos enzimáticos. Para los ensayos de fluorescencia polarizada, las muestras y los reactivos son pipeteadas en una cubeta de plástico e incubadas y después de la incubación se les mide fluorescencia. Para los inmunoensayos enzimáticos, las muestras y los anticuerpos cubiertos con látex son pipeteados en un recipiente de incubación. Una celda de matriz de fibra de vidrio es automáticamente dispensada dentro del centro de procesamiento y una alícuota del complejo inmune es transferida a la matriz de fibra de vidrio, la celda de la matriz es lavada, el conjugado y el sustrato son adicionados y la fluorescencia es medida. Los vasos de reacción son entonces vaciados en un recipiente de desechos.

Baxter Stratus II Intellect

El Stratus II Intellect es un analizador de mesa para pruebas por lotes que consiste en un carrusel de muestras, un sistema transportador de reactivos y un fluorómetro. El carrusel de muestras tiene capacidad para 30 soporte de muestras. Cada soporte de muestra contiene 3 copas. La muestra es colocada en la primer copa. Las dos copas restantes son usadas para dilución de muestras que dan valores fuera del intervalo de linealidad del ensayo. Abajo del carrusel de muestras está el rotor del sistema de transporte, el cual es mantenido a 38° C. Se pueden cargar 30 muestras para cada corrida. La clave para el Stratus es una lengüeta de una o media pulgada de ancho por dos pulgadas de profundidad que contiene un filtro de fibra de vidrio impregnado con un anticuerpo. Al principio del ensayo la lengüeta es removida de la parte alta de la pila y colocada en la plataforma de transporte. La lengüeta se mueve a lo largo de la plataforma de transporte, y la muestra y el conjugado marcado con fosfatasa alcalina son pipeteados en el centro de la lengüeta donde se lleva a cabo la inmunorreacción entera. La fracción unida del anticuerpo permanece en el centro de la lengüeta, mientras que la fracción no unida se difunde hacia la periferia, la lengüeta es lavada, el sustrato es adicionado y la fluorescencia es determinada.

El Stratus puede ser programado para preparar diluciones seriadas las cuales son útiles para pruebas como la gonadotropina coriónica humana. Las muestras urgentes pueden ser colocadas en el próximo lugar disponible en el carrusel y los resultados están generalmente

disponibles en menos de 10 minutos. El Stratus II Intellect usa un software Microsoft Windows, el cual permite al usuario almacenar curvas múltiples de calibración para un solo compuesto analizado y para coleccionar una sustancial base de datos de pacientes.

Tosoh ALA 1200

El ALA 1200 consiste en un centro de procesamiento de muestras y reactivos, un dispensador y un fotómetro. Una característica novedosa del ALA 1200 es el paquete de pruebas, que contiene un anticuerpo de captura inmovilizado en esferas magnéticas. Dependiendo del ensayo, el paquete tiene liofilizado ya sea el antígeno marcado con fosfatasa alcalina o el anticuerpo. Todas las reacciones inmunoquímicas, los lavados y las mediciones fluorescentes son realizados en este paquete listo para usarse.

El paquete de prueba es cargado con una charola de reactivos localizada bajo el área de procesamiento de muestras. Cuando la carga está completa, la charola que contiene los paquetes es llevada al área de procesamiento de muestras por un elevador activado por aire. Los paquetes son perforados, el diluyente y la muestra son adicionados y la mezcla de reacción incubada a 37° C. Después de que cada muestra es pipeteada, la punta de la pipeta es automáticamente cambiada para eliminar el acarreo entre muestras. La vibración de la charola agita las esferas magnéticas para asegurar el mezclado. Las copas son lavadas para remover la fracción no unida, se adiciona el sustrato y se mide la fluorescencia. Después de que la reacción es completada, las copas son automáticamente vaciadas en un recipiente de desechos. Las pruebas urgentes pueden colocarse en el analizador en cualquier momento y se les da prioridad. Hay una función de autodilución disponible para los ensayos que exceden la linealidad del método, y pueden ser almacenadas curvas de calibración para dos diferentes lotes de reactivos del mismo compuesto analizado. Con el ALA 1200 no pueden pipetarse las muestras del tubo primario de colección. Esta característica está disponible sólo con el ALA 1200DX

Behring Opus Plus

El Opus Plus es un sistema de mesa que usa módulos de pruebas desechables para uso único. El Opus puede operar tanto para acceso al azar como para análisis de lotes, con adición continua de muestras durante una corrida. Dependiendo del compuesto que se cuantifica, son usadas dos diferentes metodologías; un módulo de pruebas de película seca en multicapas que usa la técnica de unión competitiva para la medición de compuestos de bajo peso molecular y un ensayo inmunoabsorbente de unión a enzima (ELISA) para medir compuestos de alto peso molecular.

El módulo de película en multicapas contiene una capa dispersa, una cubierta superior, una pantalla óptica, y una capa indicadora en una base de película de poliéster. La muestra se adiciona a la capa dispersa y viaja a través de la capa superior y pantalla óptica hasta la capa indicadora. La capa superior bloquea el paso de proteínas y moléculas grandes. La capa indicadora contiene un hapteno marcado con fluorescencia y unido al anticuerpo. El compuesto analizado de la muestra desplaza al hapteno marcado de los sitios de unión con el anticuerpo. El hapteno marcado no unido se difunde en la capa de pantalla, la cual contiene óxido de hierro y evita la excitación del hapteno no unido. La intensidad fluorescente del complejo unido en la capa indicadora es medida y relacionada con la concentración del compuesto analizado.



El módulo ELISA consiste en una matriz de fibra de vidrio y dos pozos conteniendo conjugado y sustrato. La muestra es adicionada a la matriz de fibra de vidrio, la cual contiene el anticuerpo. Después de la incubación el conjugado de enzima marcada y el sustrato son adicionados. El antígeno no unido es lavado sobre tiras absorbentes y el complejo de anticuerpo fluorescente unido es medido y relacionado con la concentración del compuesto analizado.

La operación del Opus comprende la carga manual de códigos de barras de los módulos de pruebas, charolas de muestras con capacidad para 20 copas, y puntas de pipetas. Cada etapa de pipeteo implica el uso de una punta nueva lo cual elimina el acarreo. El Opus Plus ofrece sensor del nivel de líquidos y dilución en línea. El Opus Plus no puede tomar la muestra directamente de los tubos primarios de colección y no hay almacén de reactivos a bordo para el módulo de prueba. Estas características están presentes en el Opus Magnum.

Boehringer -Mannheim ES300

El Boehringer-Mannheim ES300 es un analizador de mesa que consiste en rotores de muestras, reactivos e incubador; un brazo multifuncional; un fotomultiplicador. El rotor de la muestra tiene capacidad para 150 copas que pueden ser usadas para muestras, calibradores o controles. Los reactivos son colocados en un rotor con 12 lugares. En el rotor de incubación se colocan tubos cubiertos con estreptavidina. Un brazo multifuncional contiene cuatro agujas que son usadas para pipeteado de muestras, separación las fracciones unidas de las no unidas, mezclado, y aspirado. La muestra y el anticuerpo o el antígeno marcados con peroxidasa son pipeteados en los tubos recubiertos. El mezclado se lleva a cabo por un rápido movimiento de la aguja en el tubo. Después de incubarse a 25° C, la fracción no unida es removida. Después de la adición del sustrato y el desarrollo de color, la solución es aspirada dentro de una cubeta de flujo donde son tomadas las lecturas de absorbancia a 420nm.

El código de barras para muestras y reactivos así como la dilución automática de muestras no están disponibles con el ES300. No es posible procesar una muestra urgente en el ES300 porque una vez que el ensayo se ha iniciado este debe completarse antes de iniciar una nueva serie de pruebas.

Sanofi Access

El Access es un instrumento de mesa que emplea ensayos heterogéneos de inmunoquimioluminiscencia. El Access consiste en una estación de procesamiento de muestras y reactivos, una estación de lavado/separación, y un luminómetro. El rotor de la muestra puede contener hasta 60 muestras. El pipeteo es posible desde los tubos primarios de colección o de las copas con códigos de barras. Después de que son pipeteadas 10 muestras, éstas pueden ser removidas y puede colocarse otro grupo en el rotor. En el rotor refrigerado pueden colocarse 24 paquetes de reactivos con códigos de barras listos para uso. Por cada paquete de reactivo se pueden determinar 50 pruebas. Son colocadas en el analizador 285 cubetas desechables, las cuales corresponden a 3 horas de procesamiento continuo de muestras.

La tecnología usada con el Access requiere de la adición de muestras de partículas paramagnéticas que están cubiertas con antígeno o anticuerpo seguidas por la adición de un conjugado de fosfatasa alcalina. Las cubetas son incubadas a 37° C y transferidas a la estación de lavado donde unos magnetos conducen las partículas a las paredes del tubo. Después del

lavado y aspiración de los fluidos, se adiciona un sustrato quimioluminiscente a base de dioxetano y las cubetas son desplazadas hacia el luminómetro, donde se cuantifica la luz emitida. Después de completar la reacción, las cubetas son dispensadas en un recipiente de desechos.

Diagnostic Products Corporation Immulite

El Immulite es un sistema de inmunoensayo de mesa que emplea ensayos heterogéneos quimioluminiscentes. El Immulite consiste en una plataforma de carga, carruseles de reactivos e incubador, y un fotómetro. La muestra es manualmente transferida por un operador a una copa limpia de plástico y colocada en un acarreador con códigos de barras que son cargados en una banda de transporte. Un tubo de ensayo es colocado atrás de la copa de la muestra. Una característica particular de este sistema es que todas las etapas de reacción inmunoquímica, separación, lavado, y medición ocurren en el tubo de ensayo, el cual contiene el anticuerpo unido a una esfera.

Las muestras y el conjugado con fosfatasa alcalina marcada son adicionados al tubo, el cual entonces es incubado a 37° C por 30 o 60 minutos con agitación intermitente. Los tubos son transferidos a la estación de lavado donde la fracción no unida es removida por centrifugación del tubo a alta velocidad en un eje vertical. Los líquidos son transferidos a una cámara dentro de la unidad y las esferas son lavadas varias veces para asegurar la separación de la fracción unida de la libre. Se adiciona el sustrato de dioxetano y la intensidad de la luz producida es medida por un fotómetro.

A pesar de que el Immulite no tiene un tubo directo para muestreo, una vez que la muestra es colocada en el analizador, el ensayo es completamente automático. Cinco etapas pueden ser realizadas para cada muestra. Las pruebas urgentes pueden ser cargadas en cualquier momento y colocadas al principio de la fila.

Ciba Corning ACS-180

El ACS-180 es un analizador de mesa que emplea un sistema de ensayo heterogéneo inmunoquimioluminiscente con detección luminométrica, y puede ser usado para muestras al azar o para lotes de muestras. El ensayo de unión competitiva o en sandwich puede ser usado con el ACS-180 para medir hormonas, marcadores cardíacos y proteínas. El ACS consiste en un cargador de cubetas, sistema para manejar muestras y reactivos, estaciones de lavado y separación, un luminómetro y una computadora. Las cubetas son vasos de polietileno desechables de un solo pozo para ser llenadas por el operador hasta una cantidad de 200. Las cubetas son dispensadas secuencialmente en línea a intervalos de 20 segundos. Las plataformas de muestras tienen capacidad para 60 tubos con códigos de barras en dos anillos y pueden aceptar muestras en copas o en tubos primarios de colección. Las plataformas de reactivos tienen capacidad para reactivos de 13 pruebas. Cada cartucho de reactivo contiene 50 pruebas. Cada prueba requiere 2 botellas de reactivo, una de las partículas magnéticas con anticuerpo o antígeno unido y otra con el anticuerpo marcado con éster acridinio. Después de que los reactivos y las cubetas son precalentados a 37° C, las muestras y reactivos son adicionados a la cubeta e incubados a 37° C. Las cubetas entonces son removidas de la línea hacia la estación de lavado y separación conteniendo dos magnetos, donde las partículas paramagnéticas son conducidas sobre las paredes de las cubetas. El líquido que contiene la fracción no unida es aspirado de la cubeta, y la cubeta es lavada con agua destilada. Las



partículas paramagnéticas son entonces resuspendidas en una solución de peróxido de hidrógeno, y las cubetas son transportadas al luminómetro. Una solución de hidróxido de sodio es dispensada en la cubeta, la cual oxida el éster de acridinio produciendo una señal quiminoluminiscente a una longitud de onda de 430 nm. La intensidad de la emisión es medida por un intervalo de 5 segundos. La señal colectada en el tubo fotomultiplicador es convertida a unidades relativas de luz y relacionadas con la concentración del compuesto analizado. Los contenidos de las cubetas son aspirados en un compartimento para líquidos de desecho y la cubeta cae a un recipiente de basura.

Una curva maestra de calibración de dosis-respuesta es generada por el fabricante para cada lote de reactivos. La calibración puede ser realizada por el uso de dos calibradores que son usados para ajustar la curva maestra.

Syva Vista

El vista es un analizador de mesa que usa un sistema heterogéneo para inmunoensayos fluorescentes de enzimas. El Vista usa partículas magnéticas de dióxido de cromo como el soporte sólido y la fosfatasa alcalina como la enzima marcada. En ensayos de unión competitiva, la estreptavidina es acoplada con dióxido de cromo. El compuesto analizado marcado con la enzima compete con el compuesto analizado de la muestra por los sitios de unión en los anticuerpos con biotina. Los anticuerpos con biotina son capturados por las partículas magnéticas cubiertas con estreptavidina. Un campo magnético separa las partículas unidas y después de varias etapas de lavado, el sustrato es adicionado y la fluorescencia es medida. En el formato de sandwich las partículas de dióxido de cromo están unidas a un anticuerpo. La muestra es adicionada, y el compuesto analizado se une al anticuerpo. El conjugado de enzima marcada es adicionado y después de los pasos de lavado, separación, y la adición del sustrato la fluorescencia es determinada.

El Vista consiste en un carrusel de muestras reactivos e incubador, un fluorómetro y una computadora. En el rotor pueden ser colocadas 50 muestras y en el compartimento refrigerado pueden colocarse 20 cartuchos identificados con códigos de barras. Cada cartucho está listo para su uso y puede realizar hasta 32 pruebas. Cien cubetas son colocadas en la plataforma de incubación. Cada cubeta contiene una esfera cubierta con plástico para asegurar la completa mezcla del reactivo con la muestra. El usuario introduce el número de muestra en la computadora y puede ordenar una sola prueba o perfiles de cada muestra de paciente. Las pruebas urgentes no son prácticas porque una vez que la corrida se inicia ésta debe completarse. El Vista no toma muestras directas de tubos.

BioMérieux Vitek Vidas

El Vidas es un sistema de mesa que emplea ensayos fluorescentes heterogéneos de enzima unida. La clave para el Vidas es la tira desechable de reactivos y el receptor de fase sólida (RFS). Cada tira de reactivo es provista de un código de barras y tiene 10 pozos, uno para muestra y 8 para el diluyente, solución de lavado, y sustrato. El último pozo es la cubeta óptica. El RFS, un tubo largo cubierto con antígeno o anticuerpo, también sirve como dispensador para un muestreo exacto y para la transferencia de reactivos durante el ensayo. La muestra debe ser colocada manualmente en el primer pozo de la tira de reactivos. No se requiere un volumen exacto.

Después de que la tira es colocada en el analizador, el proceso de prueba es

enteramente automático. Un volumen preciso de la muestra es extraído del tubo con RFS. El compuesto bajo análisis es capturado en la fase sólida seguido por la adición de una solución de conjugado de fosfatasa alcalina. Después de la incubación y el lavado, el sustrato es adicionado y la fluorescencia es medida a una longitud de onda de excitación de 370 nm y a una longitud de onda de emisión de 450 nm.

El operador solicita la prueba e introduce la identificación del paciente a través del teclado de la computadora. No tiene capacidad para dotar a las muestras con códigos de barras, para toma de muestra directamente del tubo, o dilución automática. Debido a que cada ensayo usa un equipo discreto de reactivos y cubetas no hay acarreo de muestras ni contaminación cruzada de reactivos.

Beckman Array 360 CE

El Array 360 CE es un sistema nefelométrico de mesa. El analizador contiene 20 pozos para reactivos y 40 pozos para muestras. Segmentos de muestras conteniendo 3 pozos son colocados en el carril de muestras. Las muestras pueden ser pipeteadas del tubo primario de muestreo en el pozo de la muestra del segmento. Dependiendo del ensayo, la dilución de las muestras es realizada automáticamente y tanto la muestra diluida como el anticuerpo son adicionados a la celda de flujo, la cual es mantenida a 26.7° C.

Para ensayos de proteínas la velocidad de formación del complejo antígeno-anticuerpo se incrementa con el aumento en la concentración de proteínas. Para determinar si un antígeno existe en exceso, se adiciona más antígeno a la reacción, si se lleva a cabo una reacción posterior, entonces el antígeno no está en exceso y los resultados son válidos. Si es adicionado más antígeno y no se observa un incremento en la formación del complejo, el valor aparece señalado por una etiqueta y el ensayo es repetido a una dilución más alta. Los medicamentos son medidos por su habilidad para inhibir la precipitación de un complejo inmune-medicamento. Un complejo medicamento-proteína y el medicamento en la muestra compiten por los sitios de unión en un anticuerpo. La velocidad de formación del precipitado decrece con un aumento en la concentración del medicamento en la muestra y es determinada nefelométricamente. Las muestras que están fuera del rango lineal del ensayo son automáticamente diluidas. Las pruebas urgentes pueden anexarse en cualquier momento. Los reactivos son asignados con sus códigos de barras y vienen empaquetados listos para su uso.

Analizadores Usados Fuera del Laboratorio

Se han introducido analizadores automáticos y semiautomáticos para su uso fuera del tradicional laboratorio hospitalario. Estos analizadores han sido usados para hacer pruebas cerca del paciente o en los consultorios médicos. El criterio de uso para escoger el analizador ideal puede incluir muchos factores: capacidad de generar resultados de una sola prueba o realizar perfiles químicos, tiempos adecuados de entrega de resultados, costo del analizador y reactivos, costo de la mano de obra, facilidad de operación, capacidad para aplicar programas de control de calidad, y un programa sencillo de mantenimiento. El analizador ideal usaría sangre como muestra, y contaría con pipeteo automático de muestras y reactivos, requiriendo escasa intervención del operador. Las curvas de calibración serían estables por un mínimo de un mes, y tendría disponible por parte del fabricante un programa de control de calidad y un programa de servicio las 24 horas. El analizador podría ser conectado a una computadora para



proveer documentación de los resultados de laboratorio y una impresión de las gráficas de control de calidad.

El sistema debe ser muy fácil de manejar porque será usado por personal con poco o ningún entrenamiento en procedimientos de laboratorio. Los reactivos secos o líquidos deben ser dotados de códigos de barras, empacados y estables por un mínimo de 6 meses. Los reactivos de químicas secas pueden ser almacenados en una pequeña área, lo cual es una gran ventaja en los consultorios médicos que llevan a cabo pruebas de laboratorio.

Algunos analizadores disponibles son mostrados en la Tabla 16-4. Estos han sido clasificados como sistemas de reactivos de química seca o húmeda.

Sistema de reactivos secos

El sistema Seralyzer usa tiras de pruebas que consisten en fibras de celulosa impregnadas con reactivos. Las tiras de reactivos son almacenadas en viales y son estables de 1 a 4 meses después de haber sido abiertos. Los parámetros de reacción para cada ensayo son programados por un módulo que está insertado en el analizador. La muestra, que generalmente requiere previa dilución, es pipeteada sobre la tira que a su vez es trasladada hasta el analizador. La luz proveniente de una lámpara de xenón incide en la tira y la luz reflejada verticalmente es conducida mediante un colimador a un filtro de interfase y es detectada por el fotodetector de la muestra. La luz reflejada también es detectada por el fotodetector de referencia. El índice de reflectancia entre la muestra y la referencia es usado para compensar por las variaciones electrónicas y la intensidad de la lámpara. Resulta difícil realizar pruebas de perfiles porque cada prueba requiere de un módulo con conexión separada.

Los sistemas Kodak DT utilizan tecnología de película en multicapas como la del analizador Ektachem 750. Cada laminilla de prueba es provista de un código de barras para identificar el ensayo y el número de lote del reactivo. Los reactivos son estables por cerca de un año. Con una pipeta especialmente diseñada que funciona con batería, las muestras son colocadas en la laminilla e incubadas por 5 minutos a 37° C, la luz ilumina la laminilla, y la cantidad de luz reflejada es relacionada con la concentración del compuesto analizado en la muestra. El incubador puede acomodar hasta 5 laminillas, permitiendo pruebas por lotes o por perfiles. El DT-60 puede realizar ensayos colorimétricos únicamente. El analizador DT-SC, el cual usa una lámpara de xenón como fuente de luz y detección mediante ultravioleta o visible, es útil para ensayos de enzimas y algunas pruebas de fármacos terapéuticos. El analizador DT-SC usa la misma pipeta y tecnología básica que el DT-60. El módulo DT-E puede ser obtenido para medir electrólitos.

El sistema Reflotron usa lengüetas con reactivos en fase sólida que contienen un código magnético para identificar las pruebas, los parámetros de reacción, y la curva de calibración para cada ensayo. La curva de calibración es establecida por el fabricante para cada lote de reactivo. La vida propia para cada lengüeta de prueba es de 1.5 a 2 años. La sangre es colocada en una plataforma de fibra de vidrio, el plasma es separado de los electrólitos por acción capilar y el volumen requerido de muestra es adicionado al reactivo a una temperatura de 37° C. El exceso de plasma es removido del área de reacción. La concentración del compuesto analizado se determina por fotometría de reflectancia. Con este sistema la sangre obtenida por punción del dedo o del talón es útil en el análisis. Ya que éste es un sistema de pruebas individuales, no resulta práctico para perfiles de pruebas.

El Analyst es un sistema de mesa que consiste de rotores de plástico, desechables

especialmente diseñados. Los rotores contienen reactivos liofilizados con códigos de barras, los cuales son estables por un año cuando se almacenan en refrigeración. Los rotores están disponibles para perfiles de pruebas o para análisis discretos. Las muestras deben ser diluidas 1:10 y 1:6 con pipetas provistas por DuPont, y dispensarse automáticamente en el rotor. Las muestras diluidas son transferidas por fuerza centrífuga a través de los capilares hasta las cubetas a lo largo del perímetro del rotor que contiene las tabletas del reactivo. Las reacciones químicas son monitoreadas a 37° C usando espectrofotometría bicromática. Después de cada perfil de pruebas, el rotor debe ser desechado siempre que un perfil completo o parcial se haya realizado. Con el Analyst los rotores están diseñados para realizar de 7 a 12 pruebas para el perfil general de química, perfil de lípidos, o el análisis discreto de un solo compuesto analizado. También está disponible por DuPont un sistema de electrodos selectivo de iones para medir sodio y potasio

El i-STAT es un analizador clínico manual que puede medir sodio, potasio, cloro, glucosa, urea (BUN), y hematocrito en sangre total usando tecnología de biosensores. Los biosensores son unos electrodos microfabricados en película delgada. El sodio, potasio y cloro son determinados por la medición potenciométrica directa de los electrodos selectivos de iones. La urea es determinada por un electrodo selectivo de iones de amonio, la glucosa es determinada por la detección electroquímica amperométrica del peróxido de hidrógeno como resultado de la reacción de la glucosa oxidasa, y el hematocrito es medido por conductividad.

El operador introduce cerca de 65 µL de sangre dentro del cartucho desechable que contiene un biosensor y un calibrador e inserta el cartucho en el analizador. La solución calibradora es transportada sobre los biosensores, y los datos son almacenados. La muestra es entonces conducida hacia los sensores donde cada compuesto bajo análisis es determinado comparando cada resultado del sensor de la muestra con el del calibrador. Los resultados analíticos están listos en menos de 2 minutos. Cuando el análisis es completado, los resultados son vistos en la pantalla de cristal líquido del analizador. Los datos también pueden ser transmitidos a una impresora o a una computadora personal y entonces al sistema de información del laboratorio.

Sistemas de química húmeda

El sistema Vision usa centrifugación de dos dimensiones con reactivos especialmente diseñados en paquetes desechables para los análisis. El paquete de reactivos es una unidad que contiene una cubeta, reactivos líquidos, y códigos de barras para identificar los ensayos. Dos gotas de muestra ya sea sangre, suero o plasma, son colocados en el paquete de reactivos que consta de múltiples cámaras, y los paquetes son colocados en un rotor del analizados con 10 lugares. El plasma es separado de los eritrocitos por fuerza centrífuga. Los paquetes son rotados un ángulo de 90 grados, el cual resulta en una cantidad premedida de muestra y reactivo que son transportadas a la cubeta. La reacción es monitoreada a 37° C, y la absorbancia es medida bicromáticamente. La sangre puede ser obtenida por punción del dedo o talón en un tubo proporcionado por Abbott. El tubo es entonces insertado directamente dentro del paquete de reactivo, eliminando así la necesidad de pipetear la sangre del tubo capilar al analizador. Los reactivos son estables por varios meses, y con este sistema pueden ser medidos de 1 a 10 compuesto analizados.



Tendencias en la Automatización

El escenario ideal para todo laboratorio clínico es la automatización de todas las etapas incluidas en la obtención y análisis de muestras y el reporte de resultados del laboratorio. La entrada de solicitudes es realizada en la estación de enfermeras y etiquetadas con códigos de barras conteniendo datos del paciente, pruebas requeridas y ubicación del tubo Vacutainer™. Después de que el flebotomista extrae la sangre, las muestras son puestas en un tubo neumático, el cual transfiere la muestra al laboratorio al área central de procesamiento. En esta forma se disminuye significativamente el tiempo que les toma a los especímenes llegar al laboratorio. La llegada de las muestras al laboratorio es monitoreada por medio del código de barras por la persona que procesa las muestras.

Una vez que la muestra llega al laboratorio o al área central de procesamiento, las etapas requeridas para el procesamiento de la muestra deben ser automáticas. Por ejemplo, la centrifugación y la división en alícuotas de la muestra en la estación de trabajo respectiva del laboratorio son tareas manuales que consumen tiempo y necesitan ser automatizadas.

La sangre total debiera ser la muestra ideal para análisis porque eliminaría los problemas asociados con la centrifugación. Si la sangre, el suero, o el plasma son utilizados para obtener los resultados de las pruebas, la muestra debe ser pipeteada directamente del tubo primario de colección. Esto eliminaría la confusión de especímenes que puede ocurrir cuando las muestras son transferidas de un tubo a una copa de muestra. El muestreo de tubos cerrados, que elimina el salpicado de fluidos biológicos cuando el tubo es destapado, debe ser usado para pruebas que requieren una sola estación de trabajo para análisis.

Los reactivos deben tener asignados códigos de barras, empaquetados y listos para ser usados sin necesidad de ninguna intervención por parte del personal del laboratorio. El tamaño de la muestra para cada ensayo debe ser pequeño, menor a 15 μL , para que el perfil de una química especificada, análisis de una droga, y pruebas de hormonas puedan ser determinadas en una muestra de 10 mL de sangre.

La consolidación de estaciones de trabajo y el análisis continuo de muestras como van llegando al laboratorio son esenciales para la operación eficiente del laboratorio clínico. Un solo analizador inmunoquímico debe ser capaz de medir un panel tiroideo, hormonas de fertilidad, marcadores tumorales y cardíacos y drogas. Además un solo sistema de química general debe ser usado para perfiles químicos y para ensayos urgentes.

Cualquier analizador usado debe ser capaz de generar gráficas de control de calidad para cada ensayo y debe tener la capacidad de conectarse con la computadora principal del laboratorio para recibir la información de las solicitudes para cada muestra y para la transferencia directa de los resultados de laboratorio al médico que los solicitó.

Bibliografía

Alpert N, editor: *Chemical Instrument Systems Newsletter*, Stamford, CT 06906.

Lifshitz MS, DeCresce RP: *The Instrument Report*, Applied Technology Associates, Inc., Chicago, IL 60614.

Pesce MA: Instrument systems for the physician's office laboratory, *J Med Technol* 2:566-569, 1985.

Tablas

Tabla 16-1, A. Comparación de las características operativas de varios analizadores automatizados para química clínica

	ACA V	Dimension AR	Hitachi 747-200	Hitachi 911	CX7
Tipo	D, SL, B	D, SL, B	D, SL, B	D, SL, B	D, SL, B
Volumen de muestra (μL)*	10 - 540	2 - 80	1 - 20	3 - 31	3 - 69
Volumen mínimo (μL)†	20 - 660	52 - 112	150	73	53 - 210
Identificación de la muestra‡	Código de barras, teclado	Código de barras, teclado	Código de barras, teclado	Código de barras, teclado	Código de barras, teclado
Reactivo	Unidad, M	Granel, M	Granel, A	Granel, A	Granel, A, M
Preparación [§]	Preempacado, añadir vol.	Añadir vol.	Añadir vol	Añadir vol.	Añadir vol.
Reducción de interferencias de matriz (proteína)	Dilución	Dilución	Dilución	Dilución	Dilución
Mezclado	Vibración (mecánica)	Ultrasónico	Agitación mecánica	Agitación mecánica	Vibración (rotacional)
Sensor/	Espec electrodo	Espec electrodo	Espec electrodo	Espec electrodo	Espec electrodo

Tabla 16-1, B. Comparación de las características operativas de varios analizadores automatizados para química clínica

	ACA V	Dimension AR	Hitachi 747-200	Hitachi 911	CX7
Características ópticas de la lámpara	Tungsteno halógeno	Tungsteno halógeno	Tungsteno halógeno	Tungsteno halógeno	Arco de Xenón
Longitud de onda, nm	340 - 600	293 - 700	340 - 800	340 - 700	340 - 670
Menú de pruebas	Quím. Gral. MFT Coag. Hormonas limitada	Quím. Gral. MFT Hormonas limitada	Quím. Gral. Hormonas limitada	Quím. Gral. MFT, DA Hormonas limitada	Quím. Gral. MFT Hormonas limitada Proteínas específicas
Repertorio de pruebas&	88	45	32	32	32

Repertorio total	98	48	70	88	63
Capacidad de stat.	Si	Si	Si	Si	Si
Tiempo de residencia (min)**	7	1 - 12	10	0.5 - 15	1 - 5
Producción (muestras/h)††	50	60	150 - 600	360	69 - 225
Producción (pruebas/hr)‡‡	50	540	6660	720	750
Lectura	Digital	Digital	Digital	Digital	Digital

Tabla 16-1, C. Comparación de las características operativas de varios analizadores automatizados para química clínica

	Ektachem 750 XRC	RA-2000	Chem-1	DAX	Paramax 720ZX
Tipo	D, SL, B	D, SL, B	D, SL, B	D, SL, B	D, SL, B
Volumen de muestra (μL)*	10 - 11	2 - 30	1 - 11	180 - 250	2 - 151
Volumen mínimo (μL)†	50	52	51	300	12 - 161
Identificación de la muestra‡	Teclado	Código de barras, teclado	Código de barras, teclado	Código de barras, teclado	Código de barras
Reactivo	Unidad, M	Granel, A	Granel, A	Granel, A	Granel, M, A
Preparación'	Preempacado, saturación	Añadir vol.	Listo para usarse	Diluyente premedido	Añadir vol.
Reducción de interferencias de matriz (proteína)	Filtración	Autodilución	Dilución	Autodilución	Dilución
Mezclado	Difusión	Movimiento lateral	Serpentines	Mecánico	Mezclador ultrasónico, mezclador de aire
Sensor/	Reflectancia, electrodos	Espec electrodo	Espec electrodo	Espec electrodo	Espec electrodo

Tabla 16-1, D. Comparación de las características operativas de varios analizadores automatizados para química clínica

	Ektachem 750 XRC	RA-2000	Chem-1	DAX	Paramax 720ZX
Características ópticas de la lámpara	Tungsteno & halógeno	Tungsteno & halógeno	Tungsteno & halógeno	Tungsteno & halógeno	Tungsteno & halógeno
Longitud de onda, nm	340 - 670	340 -600	340 - 600	340 - 804	340 - 630
Menú de pruebas	Quím. Gral. limitada MFT	Quím. Gral MFT, Hormonas limitada, proteínas específicas	Quím. Gral. DA, MFT	Quím. Gral.	Qím. Gral MFT limitado
Repertorio de pruebas&	46	26	32	26 - 34	48
Repertorio total#	46	55	43	32	45
Capacidad de stat.	Si	Si	Si	Si	Si
Tiempo de residencia (min)**	3 - 5	0.5 - 5	17	14	3.5 - 10
Producción (muestras/h)††	60	100	518	100 -300	240
Producción (pruebas/hr)‡‡	750	240 - 720	720 - 1800	2600 - 10200	720
Lectura	Digital	Impresora TRC	Impresora TRC	Impresora TRC	Digital

A, Disponible de fuentes alternativas; B, analizador de lotes; C, flujo continuo; *Coag*, análisis de coagulación; *TRC*, tubo de rayos catódicos; *D*, analizador discreto; *DA*, drogas de abuso; *M*, disponible del fabricante solamente; *SL*, selectivo; *Espec*, fotométrico; *MFT*, monitoreo de fármacos terapéuticos.

*Volumen de muestra necesario para realizar una prueba (analizador discreto) o perfil simultáneo.

†Volumen de muestra más espacio muerto en la copa de muestra.

‡Medios de identificación de la muestra en el registro final.

¶Forma de añadir el reactivo, diluyente y muestra.

/Espectrofot, fotométrico; electrodos, electrodos selectivos de iones.

&El número de pruebas disponible en una corrida, sin cambiar reactivos o módulo de instrumento.

#Número total de compuestos analizados para los que existen reactivos accesibles comercialmente.

**Tiempo aproximado entre el muestreo y la disponibilidad de la prueba.

††Número de pruebas que se pueden procesar por hora. Los datos enumerados son para un perfil simultáneo o una sola prueba por muestra.

‡‡Calculado multiplicando el número máximo de pruebas por muestra disponible x el número de muestras que se pueden procesar por hora.

Tabla 16-2, A. Comparación de características operativas de varios analizadores para inmunoquímica

	TDx/FLx	IMx	AXSYM	Stratus intellect
Tipo	B, D	B, D	SL, B, D	B, D
Volumen de muestra (μL)*	10 - 25	50 - 150	10 - 200	20 - 200
Volumen mínimo (μL)†	60 - 75	150	60 - 250	70 - 250
Identificación de la muestra‡	Capturador de código de barras, teclado	Código de barras, Teclado	Teclado	Código de barras, teclado
Reactivo	Dosis unitaria, granel, M	Granel, M	Granel, M	Dosis unitaria
Preparación'	Adición de vol.	Aspiración	Aspiración	Saturación
Reducción de interferencias de matriz (roteína)	Dilución, adición de vol.	Dilución, adición de vol.	Dilución	Filtración
Mezclado	Turbulencia forzada	Turbulencia forzada	Vibración automatizada - turbulencia forzada	Difusión
Sensor/	Fluorescencia	Fluorescencia	Fluorescencia	Fluorescencia
Menú de pruebas	MFT, química limitada, DA	MFT, AM hormonas, marcadores tumorales, marcadores cardiacos	MFT, AM, hormonas, marcadores tumorales, marcadores cardiacos	MFT, AM Hormonas Marcadores cardiacos
Repertorio de pruebas&	1	1	20	1
Repertorio total#	73	32	N/A	30
Capacidad de stat.	Si	Si	Si	Si
Tiempo de residencia (min)**	5 - 20	15 - 45	8 - 30	8
Producción (muestras/h)††	60	30 - 40	100	49
Producción (pruebas/hr)‡‡	60	30 - 40	80 - 120	49
Lectura	Digital	Digital	Digital	Digital

Tabla 16-2, B. Comparación de características operativas de varios analizadores para inmunoquímica

	ALA 1200	Opus Plus	ES300
Tipo	SL, B, D	SL, B, D	B, SL
Volumen de muestra (μL)*	10 - 100	10 - 40	10 - 200

Volumen mínimo (μL)†	110 - 200	70 - 100	260
Identificación de la muestra‡	Teclado	Teclado, código de barras	Código de barras, teclado
Reactivo	Dosis unitaria, granel, M	Dosis unitaria, M	Granel, M
Preparación'	Adición del vol.	Saturación, adición de vol.	Adición de vol.
Reducción de interferencias de matriz (proteína)	Dilución	N/A	Lavado en multietapas
Mezclado	Movimiento mecánico de esferas magnéticas	Difusión, turbulencia forzada	Agitación mecánica
Sensor/	Fluorescencia	Fluorescencia	Espec
Menú de pruebas	Hormonas, marcadores tumorales, marcadores cardíacos	MFT, hormonas, marcadores tumorales, marcadores cardíacos	Hormonas, marcadores tumorales
Repertorio de pruebas&	21	29	12
Repertorio total#	22	29	19
Capacidad de stat.	Si	Si	N/A
Tiempo de residencia (min)**	60	6 - 18	55 - 170
Producción (muestras/h)††	120	20 - 80	100
Producción (pruebas/hr)‡‡	120	20 - 80	100
Lectura	Digital	Digital	Digital
<i>AM</i> , perfil anémico (vitaminas B12, folato y ferritina); <i>B</i> , analizador de lotes; <i>D</i> , analizador discreto; <i>DA</i> , drogas de abuso; <i>M</i> , disponible del fabricante solamente; N/A, no aplicable; <i>SL</i> , selectivo; <i>Espec</i> , fotométrico; <i>MFT</i> , monitoreo de fármacos terapéuticos. *Volumen de muestra necesario para realizar una prueba (analizador discreto) o perfil simultáneo. †Volumen de muestra más espacio muerto en la copa de muestra. ‡Medios de identificación de la muestra en el registro final. 'Forma de añadir el reactivo, diluyente y muestra. / <i>Espec</i> , fotométrico; electrodos, electrodos selectivos de iones. &El número de pruebas disponible en una corrida, sin cambiar reactivos o módulo de instrumento. #Número total de compuestos analizados para los que existen reactivos accesibles comercialmente. **Tiempo aproximado entre el muestreo y la disponibilidad de la prueba. ††Número de pruebas que se pueden procesar por hora. Los datos enumerados son para un perfil simultáneo o una sola prueba por muestra. ‡‡Calculado multiplicando el número máximo de pruebas por muestra disponible x el número de muestras que se pueden procesar por hora.			

Tabla 16-3, A. Comparación de las características operativas de varios analizadores para inmunoquímica

Access	Immolute	ACS-180
--------	----------	---------

Tipo	B, SL, D	B, SL, D	B, SL, D
Volumen de muestra (μL)*	5 - 200	10 - 75	25 - 200
Volumen mínimo (μL)†	105 - 300	110 - 175	225
Identificación de la muestra‡	Código de barras, teclado	Código de barras, teclado	Código de barras, teclado
Reactivo	Granel, M	Granel, M	Granel, M
Preparación'	Autopipeteado, Adición de volumen	Adición de volumen	Adición de volumen
Reducción de interferencias de matriz (proteína)	Adición de volumen	N/A	N/A
Mezclado	Ultrasónico, girar	Agitación	Rotación
Sensor/	Quimoluminiscencia	Quimoluminiscencia	Quimoluminiscencia
Menú de pruebas	MFT, AM, hormonas	Marcadores tumorales	Marcadores tumorales, marcadores cardíacos
Repertorio de pruebas&	24	12	13
Repertorio total#	22	18	17
Capacidad de stat.	Si	Si	Si
Tiempo de residencia (min)**	12 - 75	40 - 70	20
Producción (muestras/h)††	10	120	Hasta 180
Producción (pruebas/hr)‡‡	100	120	Hasta 180
Lectura	Digital	Digital	Digital, TRC

Tabla 16-3, B. Comparación de las características operativas de varios analizadores para inmunoquímica

	Vista	Vidas	Array 360 CE
Tipo	B, SL, D	B, SL	B, SL, D
Volumen de muestra (μL)*	10 - 150	100 - 350	20 - 350
Volumen mínimo (μL)†	110 - 250	100 - 350	40 - 525
Identificación de la muestra‡	Teclado	Teclado, código de barras	Teclado, código de barras
Reactivo	Granel, M	Dosis unitaria	Granel, M
Preparación'	Adición de vol.	Preempacado, adición de vol.	Adición de vol.
Reducción de interferencias de matriz (proteína)	N/A	Preempacado	Autodilución, adición de vol.
Mezclado	Vibración, turbulencia	Acción cinética	Dilución/agitación magnética

Sensor/	Fluorescencia	Fluorescencia	Nefelometría
Menú de pruebas	Hormonas	Hormonas, batería de enfermedades infecciosas	MFT, proteínas específicas
Repertorio de pruebas&	15	16	18
Repertorio total#	9	26	40
Capacidad de stat.	N/A	Si	Si
Tiempo de residencia (min)**	78 - 114	20 - 150	1 - 2
Producción (muestras/h)††	19	15 - 90	40
Producción (pruebas/hr)‡‡	38	15 - 90	40 - 80
Lectura	Digital	Impresora	Digital
<i>AM</i> , perfil anémico (vitaminas B12, folato y ferritina); <i>B</i> , analizador de lotes; <i>D</i> , analizador discreto; <i>DA</i> , drogas de abuso; <i>M</i> , disponible del fabricante solamente; N/A, no aplicable; <i>SL</i> , selectivo; <i>Espec</i> , fotométrico; <i>MFT</i> , monitoreo de fármacos terapéuticos; <i>TRC</i> , tubo de rayos catódicos. *Volumen de muestra necesario para realizar una prueba (analizador discreto) o perfil simultáneo. †Volumen de muestra más espacio muerto en la copa de muestra. ‡Medios de identificación de la muestra en el registro final. †Forma de añadir el reactivo, diluyente y muestra. / <i>Espec</i> , fotométrico; electrodos, electrodos selectivos de iones. &El número de pruebas disponible en una corrida, sin cambiar reactivos o módulo de instrumento. #Número total de compuestos analizados para los que existen reactivos accesibles comercialmente. **Tiempo aproximado entre el muestreo y la disponibilidad de la prueba. ††Número de pruebas que se pueden procesar por hora. Los datos enumerados son para un perfil simultáneo o una sola prueba por muestra. ‡‡Calculado multiplicando el número máximo de pruebas por muestra disponible x el número de muestras que se pueden procesar por hora.			

Tabla 16-4, A. Sistemas de química clínica para uso fuera del laboratorio clínico hospitalario

	Seralyzer	DT-60 System DT-SC DT-E	Analyst	Reflotron
Fabricante	Bayer	Johnson & Johnson	Du Pont	Boehringer-Manheim
Tipo de muestra	S, P	S, P	S, P	B, S, P
Volumen de muestra (µL)	Muestra prediluida, 30	10	Muestra prediluida, 90	30
Química	Seca	Seca	Seca	Seca
Reactivo	Tira	Laminilla	Integrados en rotores	Tabletas/tiras
Reactivos codificados por barras	No	Si	Si	Si

Elección del reactivo	No	No	No	No
Ensayos disponibles	Químicas generales, enzimas, MFT	Enzimas, electrolitos, MFT químicas generales	Químicas generales, enzimas	Químicas generales, enzimas
Tiempo del ensayo (min)	0.5 - 4.0	5 3 4	10	1.5 - 3.0
Producción máxima por hora	60	65 20 15	72	20
Salida	Pantalla digital	Impresora	Pantalla digital con impresora	Pantalla digital con impresora

Tabla 16-4, B. Sistemas de química clínica para uso fuera del laboratorio clínico hospitalario

	i-STAT	Vision
Fabricante	i-STAT	Abbot
Tipo de muestra	B	B, S, P
Volumen de muestra (μL)	~ 65	2 gotas o 1 tubo capilar
Química	Seca	Húmeda
Reactivo	Reactivo individual	Paquetes de reactivos individuales
Reactivos codificados por barras	No	Si
Elección del reactivo	No	No
Ensayos disponibles	Electrolitos, HCT, glucosa, BUN	Químicas generales, Enzimas, MFT limitado
Tiempo del ensayo (min)	<2.0	8
Producción máxima por hora	90	60
Salida	Pantalla digital	Impresora
<i>B</i> , Sangre total; <i>BUN</i> , nitrógeno uréico sanguíneo; <i>P</i> , plasma; <i>S</i> , suero; <i>MFT</i> , monitoreo de fármacos terapéuticos		

Figuras

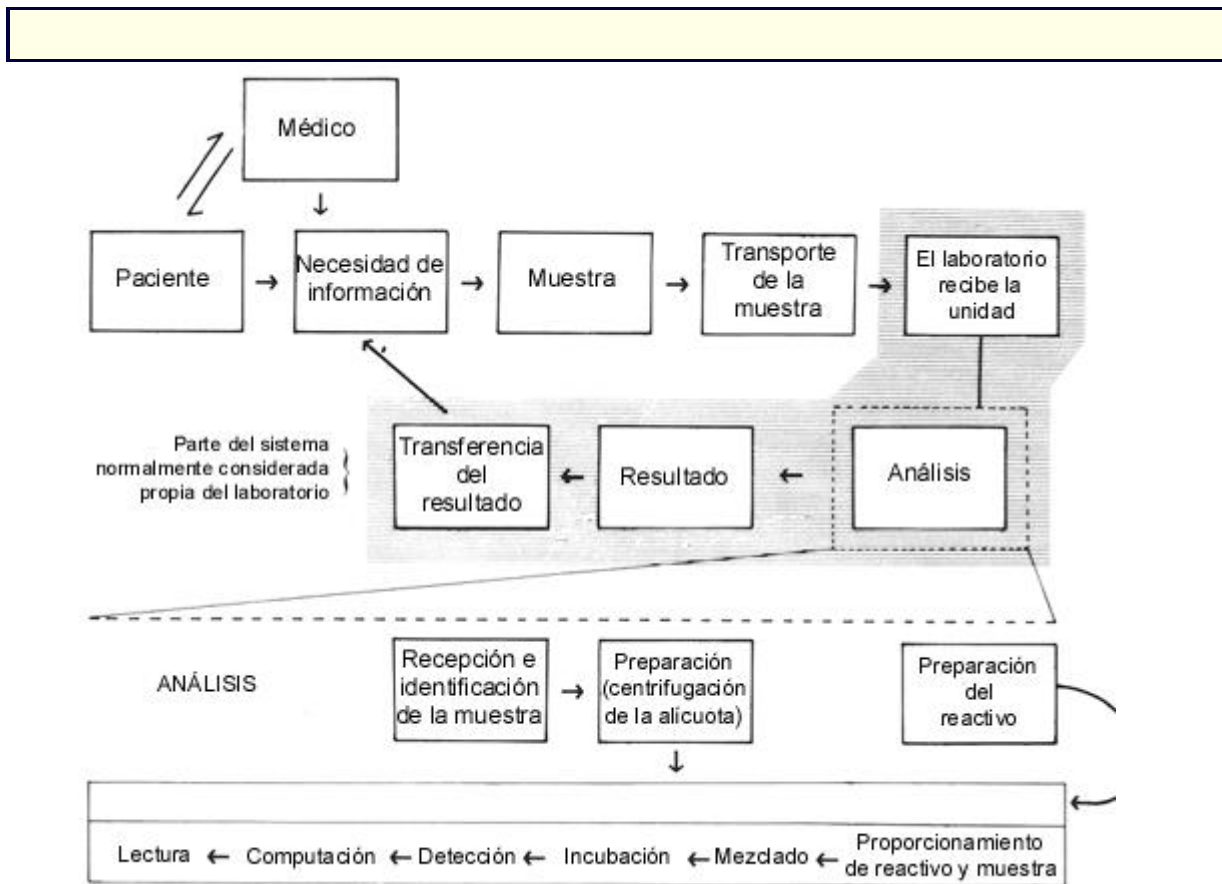


Figura 16-1 Diagrama que ilustra la muestra y el flujo de información entre el médico y el laboratorio. La porción inferior esquematiza los pasos que constituyen el procesamiento y análisis

CAPÍTULO 17

17. Pruebas de Laboratorio en el Lugar de Atención al Paciente

Ellis Jacobs

Utilización de las pruebas de laboratorio en el lugar de atención al paciente

Razones que impulsan su establecimiento y beneficios potenciales

Ventajas del manejo clínico inmediato

Inconvenientes

Puesta en marcha y monitoreo de PLAP

Normas



Entrenamiento

Coordinación del laboratorio general y de PLAP

Evaluación del costo de PLAP

Tecnología usada en PLAP

Sistemas no basados en instrumentos

Sistemas basados en instrumentos

Control de calidad de dispositivos de uso único

OBJETIVOS

- ♦ Describir que se entiende por determinaciones analíticas en el lugar de atención al paciente.
- ♦ Describir los beneficios que aporta las PLAP al clínico, distinguiendo entre los verdaderos y los percibidos.
- ♦ Conocer las normas y describir la coordinación interdepartamental requerida para las PLAP.
- ♦ Describir las tecnologías utilizadas en los dispositivos las PLAP, incluyendo reactivos e instrumentos.
- ♦ Describir las diferentes perspectivas sobre como abordar el control de calidad entre las PLAP y el laboratorio central.

Términos Clave

CLIA '88 ('Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988') Conjunto de normas federales que gobiernan los procedimientos de los laboratorios clínicos y las prestaciones de pruebas diagnósticas realizadas (ver Capítulo 2).

ex vivo Una prueba diagnóstica que se realiza en una muestra extraída temporalmente de un organismo vivo, para su análisis y después se reintegra al organismo.

gestión total de la calidad Un concepto que se propone una gestión y mejora continua de la calidad. TQM potencia las prestaciones de un equipo o institución sobre las individuales o departamentales ("Total quality management" o "TQM", en inglés).

in vitro Literalmente "en vidrio", una prueba diagnóstica realizada en una muestra que es extraída permanentemente del organismo.

in vivo Literalmente "dentro de lo vivo", una prueba diagnóstica en la que un analito es medido dentro de un organismo vivo.

pruebas de laboratorio descentralizadas Pruebas del laboratorio que son competencias del hospital o centro sanitario pero se realizan físicamente fuera del laboratorio central.

pruebas dispensadas ("waived testing") Es una categoría de complejidad establecida por el CLIA que engloba aquellas determinaciones con un mínimo riesgo de producir resultados erróneos. A esta categoría pertenecen las pruebas que han sido aprobadas por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos para utilización por el propio paciente en su domicilio.

pruebas en el lugar de atención al paciente (PLAP) Pruebas diagnósticas que son realizadas cerca del sitio donde el paciente esta siendo atendido. Si son realizadas dentro de un hospital también puede llamarse pruebas descentralizadas. Se denominan "Point Of Care Testing" o "POCT", en inglés)



Existen muchos nombres para aquellas determinaciones de laboratorio que implican procedimientos realizados cerca de la cama o lugar donde se atiende al paciente (Tabla 17-1). El Colegio Americano de Patólogos (CAP) recientemente cambio en su lista de revisión (Sección 30) la denominación *pruebas auxiliares* por *pruebas en el lugar de atención al paciente* (PLPA). La "Joint Commission on Accreditation of Healthcare Organizations" (JCAHO) ha reemplazado en sus requerimientos el término *pruebas descentralizadas* por *pruebas dispensadas* para denominar a las pruebas diagnósticas que no se realizan dentro del escenario "tradicional" de un laboratorio. Son pruebas diagnósticas que serán realizadas generalmente por personal ajeno al laboratorio. En general, los dispositivos de monitoreo como catéteres intra-arteriales para gases sanguíneos y oxímetros de pulso que están conectados al paciente (ya sea de forma interna (in vivo) o externa), no están sujetos a las regulaciones federales por CAP o JCAHO, porque aún cuando sean tipos de pruebas orientadas al diagnóstico, con estas técnicas no se extrae ninguna muestra del organismo.

Antes de tomar la decisión de implantar un sistema de pruebas próximas al sitio donde el paciente esta siendo atendido (PLAP), deben analizarse cuidadosamente los verdaderos costos y beneficios en cada situación clínica. ¿Se produce una mejora significativa en el cuidado del paciente o en el resultado final obtenido? ¿Cuál es el balance económico *total* (no solo considerando el costo del equipo y consumibles) de las diversas opciones que pueden ofrecer un servicio diagnóstico adecuado? Aspectos adicionales a considerar contemplan la integración de los datos dentro la historia clínica y la supervisión y control de las determinaciones de acuerdo a las normas y estándares profesionales y de las agencias reguladoras.

Uso de las Pruebas Cerca del Paciente

Razones que impulsan su establecimiento y beneficios potenciales

Los motivos que justifican o impulsan un sistema de PLAP (designado "Point of Care Testing" o "POCT", en inglés) son diversos en función de su aplicación clínica. En consultas externas, la capacidad para obtener los resultados de las pruebas *durante* la visita del paciente es importante tanto para el paciente como para el médico y es un fuerte motivador económico de las PLAP. Sin embargo en el ámbito hospitalario y con excepción de los pacientes diabéticos, el establecimiento de un sistema de PLAP está basado en otros factores. Las PLAP puede cubrir las necesidades clínicas de disponer rápidamente de resultados en las unidades de cuidados intensivos, quirófanos, o servicios de urgencias. Además ciertas PLAP tales como sangre oculta en heces y tiras de orina, pueden ser fácil y correctamente usadas en las unidades de enfermería. Finalmente, dado que en los pacientes diabéticos en tratamiento intensivo con insulina se precisa la realización de glucosas preprandiales cuatro veces al día, la mayoría de los hospitales han establecido programas para determinar la glucemia en el lugar de atención al paciente. Tanto en pacientes ambulatorios como en ingresados se asume que unos resultados más rápidas mejorarán el inmediato manejo médico.

Dentro del sector de los servicios sanitarios, el aspecto económico es un elemento esencial. En los pacientes hospitalizados, las empresas de atención a la salud tienen entre sus objetivos que la optimización del cuidado médico del paciente permita reducir el tiempo de estancia ya sea en la unidad de cuidado intensivo, UCI, o dentro del hospital en general. Los

costos asociados con la estancia hospitalaria son uno de los mayores componentes mayores del costo total del sistema sanitario y por otra parte los costos asociados a UCIs (cardiología, neonatal, o quirúrgica), son mucho más grandes que los costos de unidades hospitalarias generales. Si el disponer de unas pruebas con resultados más rápidos pudiera disminuir los tiempos de estancia de los pacientes en la ICU y en general en el hospital, el costo derivado de la puesta en funcionamiento de PLAP estaría justificado. Hasta ahora esto *no* ha sido demostrado (ver mas adelante). En hospitales, el creciente desarrollo de PLAP es consecuencia en parte, de la imposibilidad del laboratorio central para satisfacer algunas de las necesidades clínicas. Sin embargo con una adecuada modernización de los medios disponibles, el laboratorio central es capaz de competir con las pruebas en la cabecera del paciente en costos y tiempo de entrega de resultados (consulte el trabajo de Winkelman et. al., 1994, en la bibliografía).

Los posibles beneficios de PLAP en el ámbito hospitalario se muestran en la Tabla 17-2. La mayoría de las ventajas para médicos, enfermeras, pacientes y administración, están basadas en la máxima de que "más rápido es mejor" y por tanto si las pruebas realizadas en el punto de atención al paciente proporcionan resultados más rápidos mejorará la atención médica y la utilización de los recursos del hospital (consumibles, camas, personal). Otras posibles ventajas son la disminución del volumen de muestra, debido a posibilidad de utilizar sangre capilar extraída mediante punción en el dedo en lugar de tubos. También aumenta la sensación del paciente de participar directamente en su propio cuidado. Para el laboratorio, una ventaja es la posibilidad de mejorar las fases pre-analíticas y post-analíticas. En la fase pre-analítica se producirían menos problemas de identificación y pérdida de muestras. Adicionalmente, se reducirían las posibilidades de modificaciones en la concentración de los compuestos analizados causadas por la demora entre la toma de muestra y su análisis. Ambos aspectos deberían además reducir la variancia pre-analítica. También mejora el tiempo de respuesta en la entrega de resultados al médico solicitante.

Ventajas del cuidado médico inmediato

El uso primordial del sistema de PLAP en hospitales es la valoración y el rápido estudio de pacientes de cuidados críticos. Aún cuando más de 40 diferentes compuestos analizados han sido evaluados como posibles pruebas para el lugar de atención del paciente, basados en el criterio de necesidad clínica inmediata, solo los gases sanguíneos, electrolitos (Na^+ , K^+ , Ca^{++}), tiempo de protrombina (PT), tiempo parcial de tromboplastina (PTT), tiempo de coagulación (ACT), hematocrito o hemoglobina, y glucosa deberían ser considerados para su determinación en el punto de atención al paciente.

Otras pruebas pueden ser realizadas en el lugar de cuidados por cuestiones prácticas o por formar parte de perfiles diagnósticos en unidades críticas. Debe demostrarse que la utilización de estas pruebas diagnósticas en punto de atención al paciente mejorará el cuidado del paciente. Sin embargo, acciones como el monitoreo intraoperatorio de potasio durante una cirugía cardiaca ha sido asociada con una reducción del 50% en arritmias y una disminución del uso de fármacos antiarrítmicos. Hay estudios que también indican como resultados mas rápidos en una prueba de coagulación pueden mejorar el manejo del tratamiento con anticoagulantes después de la terapia trombolítica o bien disminuir el sangrado microvascular después de cirugía de derivación cardiopulmonar



Inconvenientes

La consideración más importante para implantar un sistema de PLAP es si se trata del modelo de análisis más adecuado para una situación clínica particular. Hay varias formas, entre ellas el punto de atención al paciente, de determinar constituyentes críticos. Estas determinaciones pueden realizarse en la sección de urgencias del laboratorio central o en un laboratorio de urgencias separado del laboratorio principal. Una variante de este último modo serían laboratorios satélite concretos en los puntos de cuidados como laboratorio para determinar gases sanguíneos en quirófano. Para determinar que modelo de análisis se adecúa mejor a las necesidades concretas del punto de cuidados es necesario considerar tanto los aspectos, clínicos como los económicos (ver pág. 318). Tomar esta decisión, necesita pues obtener datos de la eficacia de PLAP en las diferentes situaciones clínicas. El mayor inconveniente de las PLAP es su costo. Los costos en consumibles y reactivos de los analizadores utilizados en PLAP son mayores que los de los sistemas tradicionales de laboratorio, por lo que poner en marcha un sistema de PLAP tiene un costo más alto. Otros aspectos a considerar son (1) La realización y documentación del control y la garantía de la calidad, (2) control de las pruebas diagnósticas, y (3) correcta integración y flujo de los datos. A pesar de la posible reducción de la varianza pre-analítica basada en la disminución de la manipulación de la muestra y del tiempo de demora entre la obtención y análisis de la muestra; otras variantes pre-analíticas surgen del PLAP. Cuando mediante la punción en el dedo se obtienen volúmenes de muestra del orden de microlitros, si el lugar de punción no está correctamente preparado, se puede producir una contaminación significativa de la muestra con alcohol u otro desinfectante. El estado fisiológico del paciente influye de forma más significativa en el resultado obtenido en muestras mediante punción del dedo u otros procedimientos no invasivos que cuando se obtienen muestras arteriales o venosas. En un paciente con deficiente circulación periférica, las muestras por punción del dedo son difíciles de obtener y frecuentemente se contaminan con líquido intersticial (ver Capítulo 3). Adicionalmente, los resultados de las PLAP pueden no ser trazables con los del laboratorio principal debido a las diferencias bioquímicas entre las fuentes de obtención de las muestras (arterial, venosa, o capilar) o el tipo (sangre total, plasma suero).

La rápida disponibilidad de los resultados con PLAP crea un dilema de aseguramiento de la calidad. Los datos pueden ser vistos y usados antes de que hayan sido revisados para control de calidad u otro mecanismo externo que asegure la credibilidad de los resultados. Por lo tanto es crítico que los dispositivos para PLAP tengan integrados sistemas de control de calidad/aseguramiento de la calidad. Estos sistemas automáticos evitan que resultados erróneos sean vistos por el médico tratante.

Puesta en Marcha y Monitoreo de Plap

Regulaciones

A pesar de su relativa simplicidad, la implementación y uso de PLAP está sujeta a varias regulaciones asociadas con las determinaciones de laboratorio. The Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988 (CLIA'88) somete a todas las pruebas de laboratorio a regulación e inspección federal. Estas regulaciones son "neutrales" con respecto al lugar donde se realice la determinación, lo cual significa que todas las pruebas de laboratorio deben

cumplir los mismos estándares de calidad. Los organismos estatales y locales, así como los no gubernamentales (tales como CAP y JCAHO) pueden promulgar normas que sean más, pero no menos, estrictas que las regulaciones federales.

Los procedimientos de análisis establecen cuatro categorías de complejidad: dispensada, moderada complejidad, alta complejidad y microscopía realizada por médicos (ver también Capítulo 2). La complejidad de una prueba se determina mediante 7 criterios que evalúan conocimiento, entrenamiento, preparación de materiales y reactivos, manejo técnico, características de CC/AC, mantenimiento y solución de problemas, y juicio e interpretación. Hay 9 pruebas dentro de la categoría de dispensadas (Tabla 17-3), y las inspecciones y regulaciones para los laboratorios que realizan solo estas pruebas, son mínimas. Sin embargo, si estas pruebas son realizadas en una institución acreditada por CAP o JCAHO, serán en esencia reguladas del mismo modo que las pruebas realizadas con los procedimientos habituales de laboratorio. También, seis pruebas que los médicos realizaban por microscopía han sido dispensadas de los requerimientos de acreditación: examen en fresco, preparaciones con KOH, exámenes de oxiuros, examen de ovulación, sedimento urinario y exámenes post-coitales. Todas las pruebas realizadas mediante PLAP caen dentro de las categorías dispensadas o de moderada complejidad. Los laboratorios que determinen o sean responsables de la realización de pruebas de moderada complejidad en el sitio de atención al paciente también pueden realizar o ser responsables de las pruebas dispensadas y deben cumplir todos los requerimientos de acreditación de personal, control de calidad interno, capacitación para la realización de pruebas (control externo), gestión de las pruebas solicitadas a los pacientes, aseguramiento de la calidad e inspecciones.

Los estándares para el personal que realiza pruebas dispensadas son mínimos. Sin embargo, en diez estados (tales como California, Florida y Nueva York) se requiere de una autorización o formación como técnico médico aun para la realización de las pruebas catalogadas como dispensadas. Si se revisan los requerimientos de personal para pruebas diagnósticas, independientemente de la categoría de pruebas y su localización, se necesita lo siguiente:

- Conocer a los responsables de la realización, dirección y supervisión de las pruebas.
- Que haya un numero adecuado de personas entrenadas para realizar las pruebas.
- Que el personal reciba regularmente entrenamiento dentro del servicio.
- Que se evalúe la competencia en la realización de pruebas cada tres años.

Como para cualquier prueba de laboratorio, deben establecerse por escrito la política y procedimientos que afectan cada aspecto de PLAP. Deberían existir políticas y procedimientos para la preparación del paciente, extracción, colecta y conservación de la muestra, calibración del instrumento, control de calidad y acciones correctoras, evaluación de las prestaciones del equipo y de la prueba, registro de resultados e informes. Las regulaciones estatales en varios estados, incluyendo New York, New Jersey y Pennsylvania, establecen que el laboratorio central debe supervisar las PLAP y que el director del laboratorio es el



responsable de los estándares de prestaciones en áreas tales como CC, AC, y utilización de las pruebas de acuerdo a criterios de costo-eficacia.

Cada laboratorio o cada lugar donde se realicen pruebas *no* dispensadas, debe establecer por escrito políticas en relación con el aseguramiento de la calidad. Tiene que existir un sistema continuo para monitorear y evaluar los datos de control de calidad interno y externo. Diariamente deben materiales de control con dos o tres diferentes concentraciones. Se deben registrar y mantener las acciones tomadas para corregir resultados de control de calidad fuera de los límites. Antes de poner en marcha por primera vez un instrumento, es preciso realizar estudios de linealidad que permitan valorar el intervalo analítico y repetir estos estudios a intervalos de 6 meses. También realizar en paralelo estudios de correlación para analizar los resultados de una misma muestra obtenidos por un sistema primario y el dispositivo que se va a poner en uso en el sitio de atención y así mismo repetir este estudio cada seis meses. Algunos estados pueden requerir incluso evaluaciones mas frecuentes. Los estándares federales requieren para los métodos primarios de pruebas una prueba de control externo de la calidad tres veces al año, pero las regulaciones estatales o del CAP pueden requerirla para todos los sistemas de análisis de pruebas.

Finalmente, las regulaciones requieren de un adecuado mantenimiento de registros. Este es un componente integral tanto en los procedimientos de gestión de datos de pacientes como en los de garantía de la calidad. La siguiente información debe ser grabada en los registros e informes:

- Hora, fecha, resultados de la prueba, e identificación del operador para cada análisis.
- Datos de control de calidad (resultado, hora, fecha, identificación del operador).
- Mantenimiento y validaciones del dispositivo para PLAP.
- Acciones tomadas para corregir resultados de control de calidad fuera de límites.
- Entrenamiento inicial y recertificación del personal.

Capacitación

Las pruebas en el lugar de atención al paciente pueden ser o no ser realizadas por personal del laboratorio. Entre los profesionales que pueden intervenir en la realización de estas pruebas se encuentran: enfermeras, anestelistas, sanitarios relacionados con terapia respiratoria, y asistentes médicos.

Los requerimientos federales, estatales y locales acerca del personal que puede realizar PLAP son mínimos. El director del laboratorio, como responsable del proceso analítico, debe establecer a menudo requerimientos adicionales. Los requerimientos mínimos de preparación y experiencia necesarias para la realización de PLAP varían desde el diploma de preparatoria sin experiencia hasta un bachillerato en ciencias con 2 años de experiencia. En casos específicos, otros profesionales de la salud pueden estar calificados para realizar PLAP de acuerdo con las competencias que el estado establece para sus estudios, tal es el caso del



técnico en terapia respiratoria con respecto al análisis de gases sanguíneos.

El grado de entrenamiento requerido para permitir realizar PLAP depende tanto del curriculum del individuo implicado como del sistema analítico que va a ser empleado, o lo que es igual, de la dependencia técnica del dispositivo empleado para PLAP. Hay siete aspectos principales que deben ser incluidas en el programa de entrenamiento (Tabla 17-4). La cantidad de tiempo requerida para cada aspecto varía dependiendo del personal y del sistema empleados. Además del aprendizaje en las etapas concretas involucradas en la realización de la prueba, es muy importante que se aborden los aspectos de control y aseguramiento de la calidad. La mayor fuente de error tanto en PLAP como en el resto de pruebas, es el error pre-analítico, así que resulta fundamental que sea revisado adecuadamente durante el programa de entrenamiento. Las fuentes de error pre-analítico son ampliamente tratadas en el Capítulo 3. El programa de entrenamiento debe incluir exámenes escrito y práctico tanto previa como posteriormente al entrenamiento, que demuestren un aceptable rendimiento en la obtención de las muestras y en la realización del análisis. Todos los individuos deben participar en un curso anual de recertificación, que debería también incluir un examen escrito y una demostración práctica la realización de la prueba. Debe haber un mecanismo para que sobre la base de las prestaciones técnicas y al cumplimiento de las normas o políticas, se pueda autorizar o denegar tanto a personas la realización como a unidades la utilización de PLAP. La autorización será restituida después de un reentrenamiento y demostración de competencia.

Coordinación del laboratorio central y las PLAP

La descentralización del análisis de las muestras fuera del laboratorio, incrementa el contacto directo del laboratorio con otros equipos sanitarios. Debido a que las PLAP pueden proporcionar una mejor atención médica en términos de costo-eficacia, la implementación de éstas es un proyecto de gestión de la calidad total (Tabla 17-5). Los aspectos de mejora de la calidad son complejos y sus efectos están determinados por el hecho de que las PLAP constituyen un concepto interdisciplinario que cruza muchas fronteras dentro de un hospital. Por tanto la implementación correcta de un sistema de PLAP requiere ser abordada en forma multidisciplinaria para su establecimiento, revisión de su cumplimiento y preparación de la futura dirección del o los programas.

Comité interdisciplinario.

Para que un programa de PLAP funcione de forma eficiente, éste debe ser estructurado a través de un equipo multidisciplinario. Debe constituirse un comité de PLAP interdisciplinario con representación de todas las disciplinas involucradas, tales como medicina, enfermería, laboratorio, terapia respiratoria, y la administración. El comité deberá estar coordinado por el director del laboratorio o la persona que el asigne. La función del comité es determinar los planes institucionales, definir el nivel de servicio que se proporcionaran, evaluar y seleccionar la instrumentación y equipos que serán usados, y asignar tareas dirigidas al cumplimiento de las regulaciones. El comité debe revisar todas las propuestas de programas adicionales de PLAP, y si una es aprobada, el comité debe emitir guías prácticas, es decir, cual será el sistema analítico, quien lo va a manejar, etc. El laboratorio clínico es el servicio que está en la mejor posición para evaluar nueva tecnología, diseñar programas de entrenamiento y ayudar a identificar posibles dificultades en el uso de los nuevos sistemas.



Personal participante en la realización de las pruebas.

La responsabilidad última y el control de PLAP recaen sobre un laboratorio certificado por CLIA y al menos un profesional de laboratorio debe ser asignado por el mismo laboratorio para el programa de PLAP. Los deberes esta persona responsable del sistema de PLAP están resumidos en el cuadro de abajo.

Funciones del Personal de Laboratorio Asignado al Programa de PLAP

- Evaluar y probar los dispositivos o instrumentos de análisis
- Ayudar a escoger el instrumento final de prueba
- Realizar estudios de validación antes de poner en uso un nuevo dispositivo incluyendo linealidad y correlación
- Colaborar en entrenamiento y reentrenamiento
- Coordinar las pruebas de control externo de la calidad
- Asegurar y documentar el cumplimiento de los procedimientos requeridos
- Realizar la revisión preliminar de los datos de control de calidad
- Proporcionar asistencia técnica y de solución de problemas

Si existe mas de un programa en PLAP, uno de los laboratoristas deberá ser nombrado como coordinador del laboratorio descentralizado para supervisar y coordinar el programa completo de PLAP. Las obligaciones de este individuo se mencionan en el siguiente cuadro.

Funciones del colaborador en la coordinación de PLAP

- Entrenar y supervisar a los técnicos
- Asegurar que las PLAP en conjunto cumplen las normas y regulaciones establecidas
- Revisar cada día los datos de CC
- Remitir mensual y trimestralmente los informes de CC a cada unidad de PLAP
- Producir un informe anual sobre el programa en el ámbito hospitalario
- Desarrollar y coordinar programas de formación para el personal del lugar de atención al paciente

Monitoreo de la garantía de la calidad.

Como ya se mencionó previamente, incluso las pruebas dispensadas están asociadas con estándares concretos. Por ejemplo algunas regulaciones estatales como las de New York, New Jersey y Pennsylvania requieren que el director del laboratorio sea el responsable de los estándares de desempeño en todas las áreas de PLAP, incluyendo la garantía de la calidad. Al igual que para las determinaciones del laboratorio central, el monitoreo del AC implica mucho mas que una simple revisión de los datos de CC. Todos los sistemas de PLAP tienen problemas con los cumplimientos de los requisitos de AC, especialmente con el mantenimiento y conservación de registros y la realización del CC. El grado de incumplimiento está directamente relacionado con el tamaño y complejidad del programa. Algunos de estos problemas están causados por la falta de entendimiento de las normas reguladoras concernientes al mantenimiento y conservación de registros, a lo que significa realmente el CC y a las causas de error en los resultados. Adicionalmente, presiones externas como el exceso de trabajo que es fácil encontrar en UCIs de alta ocupación, servicios de urgencias, etc., pueden llevar a incumplimientos. Una vez el sistema de PLAP ha sido establecido el seguimiento tanto del personal como del cumplimiento de las normas, planes y procedimientos requiere más atención de la que se necesita para el seguimiento de los sistemas analíticos.

La motivación del personal es un factor crítico para obtener éxito en el programa de AC, especialmente en programas muy amplios como la determinación de glucosa junto al paciente, donde el número de operadores puede ser de varios cientos. En estos casos los sistemas son tan complicados y sensibles a factores diversos y ajenos al laboratorio que es imprescindible un monitoreo continuo para poder realizar acciones destinadas a mantener sino a mejorar la calidad global del servicio.

El monitoreo y control del AC se realiza a diversos niveles residiendo la responsabilidad conjunta en el laboratorio (Tabla 17-6). Las enfermeras o supervisores de enfermería atienden a los planes, normas y desarrollo del trabajo en el ámbito del día a día. Para asegurar un alto grado de cumplimiento de las normas, planes y procedimientos se necesitan revisiones semanales y mensuales que suelen ser llevadas a cabo por supervisores o colaboradores de PLAP. Una vez al mes el personal colaborador genera un informe de CC para cada unidad especificando el grado de cumplimiento con los planes y procedimientos, centrándose en el mantenimiento de registros e instrumentos. El informe de CC suele incluir tanto datos estadísticos como una explicación de los mismos en forma de texto. También debería resumir las cifras totales de pruebas realizadas para cada unidad de PLAP y para el conjunto. Mensualmente, el responsable del programa (director del laboratorio o colaborador) junto con representantes de enfermería, debe realizar unas rondas de auditorias. Estas además de constituir un segundo nivel de revisión, se centran en asegurar la correcta entrada de los registros en las estaciones de trabajo, el sistema informático de laboratorio, y en la historia clínica del paciente. Es mas, estas auditorias constituyen una nueva vía para la intercomunicación de PLAP y muestran a los operadores del sistema, la importancia y el compromiso de la institución con la calidad. Para cada AC/CC deben establecerse limites de aceptabilidad. Por ejemplo, más del 95% de todos los resultados generados por los medidores de glucosa, deben ser tabulados y representados. Igualmente deben de definirse las actuaciones cuando algún no se cumple. El planteamiento del TQM ayuda a mejorar el sistema de PLAP. Los criterios y respuestas pueden ser definidos ya sea por el comité interdisciplinario o por el de usuarios finales.



El comité de usuarios finales es otro punto esencial de las PLAP. Este comité distinto del interdisciplinario (que establece y revisa los programas de PLAP), debe reunirse bimensualmente para discutir los informes de cumplimiento así como para comentar los temas y problemas que surjan en el programa. Puede proponer cambios para que sean considerados por el comité interdisciplinario. El comité interdisciplinario se reúne bimensualmente o antes si las circunstancias así lo requieren, para considerar las recomendaciones del comité de usuarios, revisar y discutir el programa en conjunto y establecer las líneas futuras.

Evaluación del Costo de un Sistema de Plap

Hasta ahora es muy difícil de llevar a cabo una evaluación costo/beneficio de la verdadera eficacia de las PLAP. Esto es debido a que no hay disponibles suficientes datos de PLAP. Los costos asociados con las PLAP dependen de los servicios que proporcionan habitualmente y de los nuevos que se planifiquen.

Cuando se evalúa el impacto económico del sistema de PLAP es preciso mirar el escenario en conjunto, no sólo los costos directos concretos de la realización de la prueba (ver capítulo 2). Hay a menudo ahorros asociados con una mejora en la calidad del trabajo, como la disminución en la repetición de pruebas, en la variación pre-analítica, la mejora en la gestión del paciente. Las determinaciones junto a la cama del paciente tienden a producir unos mayores costos variables que las pruebas tradicionales, reflejo de los costos de los reactivos, consumibles y flexibilidad del personal. Sin embargo los gastos fijos como el equipamiento, su mantenimiento, CC, ubicación y necesidades de personal son significativamente menores.

El costo de cualquier determinación analítica, ya sea en un laboratorio central o en PLAP, puede realizarse desde una perspectiva micro (centrada en el costo) o macroeconómica (sistemas de tarifa). La primera considera todos los gastos fijos y variables relacionados con el centro de costo considerado, es decir, laboratorio, unidad de enfermería, gastos de quirófano. Ahora bien, ¿deben incluirse en el análisis de costos los tiempos asociados a la realización de las determinaciones o es correcto capturarlos como un tiempo de carácter estructural y por ello "gratuito"? Es muy importante que todo el trabajo asociado con las determinaciones sea tenido en cuenta y que no se asuma nada libre de cargo. Aun cuando PLAP solo emplee un par de minutos por prueba, es un tiempo añadido. En el Mount Sinai Medical Center el personal de enfermería cada mes determina alrededor de 15,000 glucemias mediante punción en el dedo. A un promedio de 9 minutos para la toma de muestra, análisis y registro de resultados (Winkelman et al., 1994), el tiempo total es de unas 27,000 horas de enfermería por año. Sin incluir el tiempo destinado a control de calidad y otras funciones como entrenamiento y supervisión. Este tiempo actualmente no se incluye en los costos, pero a medida que las instituciones reestructuren las tareas y puestos de trabajo, estos tiempos habrán de tenerse en cuenta.

La aproximación macroeconómica se integra dentro de la gestión total de costos. Es un modelo en el se consideran todos los costos, incluidos los preventivos, de evaluación y ocasionados por fallos internos o externos de la calidad del sistema. Los *costos preventivos* son los derivados de introducir mecanismos para proteger los errores de proceso. Incluyen determinaciones de CC, entrenamiento del personal, formación continua y mantenimiento preventivo. Los costos empleados para establecer si el sistema cumple sus requerimientos son



los *costos de evaluación*. Estos incluyen los de CC externo, inspección y acreditación y auditorías de AC internas. Los *costos de fallos internos* son los que derivan de un proceso analítico de malas prestaciones. Ejemplos son la repetición en la recolección de muestras, resultados ya carentes de valor por la demora en su entrega, repetición de pruebas para su confirmación incluso por una segunda metodología. Los *costos por fallos externos* derivan de unas deficientes prestaciones en procesos (externos al análisis) de los que es responsable. El receptor de los resultados. Entre ellos cabe señalar la toma de decisiones clínicas incorrectas basadas en resultados inexactos o fuera de tiempo; exceso en la repetición de pruebas y sobreutilización de las determinaciones urgentes. Sin embargo, hay que señalar de nuevo que el cálculo de los costos merece ser juzgado considerando el valor añadido en el cuidado del paciente (¿produce el costo adicional unos mejores resultados?), y en el balance económico global del sistema (¿el sistema de PLAP reduce la estancia media?) ver Tabla 17-2.

Tecnología Usada en Plap

El entorno en el que se implanta un sistema de PLAP es diferente del de un laboratorio central, esto es consecuencia de unos flujos y cargas de trabajo también distintos. Mas aún, el personal involucrado en PLAP está orientado hacia la obtención rápida de resultados que se utilizarán inmediatamente en el cuidado del paciente. A diferencia del personal de laboratorio, quien está necesariamente comprometido con los procedimientos asociados a su especialidad como son CC, procesos analítico, registro y mantenimiento de los datos y observación de las normas y regulaciones. En consecuencia las características deseables de un sistema de PLAP (Tabla 17-7) tienen puntos comunes y otros distintos de las de laboratorios clásicos. Las diferencias más significativas incluyen una prioridad en los sistemas del sitio de atención al paciente hacia sistemas prácticos y fáciles de manejar, que no requieran venipunción ni pipeteos precisos, que sean lo más independientemente posible desde el punto de vista tecnológico y que tenga un sistema de registro automático de los datos que cumpla las normas pertinentes.

Sistemas no basados en sistemas sin instrumentación

La mayoría de sistemas de PLAP no están basados en instrumentos. Utilizan inmunoensayos competitivos o no competitivos, enzimáticos o reacciones químicas con una lectura a punto final (Tabla 17-8). Son variados los tipos de muestra que admiten estos sistemas, sangre total, suero, plasma, orina, líquido amniótico, saliva y heces. La presentación predominante de estos sistemas se basa en la lectura visual de un indicador que produce una interpretación positiva o negativa. Los sistemas basados en inmunoensayos competitivos o no competitivos se utilizan para detectar una gran variedad de compuestos como la gonadotropina coriónica humana, drogas de abuso, madurez pulmonar fetal, marcadores cardíacos, marcadores de enfermedades infecciosas. Otro grupo importante de ensayos cualitativos son la detección de hemorragias ocultas en heces empleando un papel impregnado con el reactivo y posteriormente una producción de color. Las tiras de glucosa que tras dos reacciones enzimáticas acopladas producen una coloración de lectura visual. La concentración de glucosa puede ser semicuantificada por comparación visual del color desarrollado en una escala o medida por colorimetría de reflexión. Las tiras de orina también son semicuantitativas



y emplean reacciones enzimáticas y químicas para generar un producto coloreado. Hay unos pocos sistemas no basados en instrumentación que utilizan reacciones enzimáticas o químicas y técnicas inmunocromatográficas para determinar concentraciones de lípidos y fármacos terapéuticos.

Sistemas basados en la instrumentación

Los sistemas de PLAP basados en la instrumentación cada vez están alcanzando un mayor grado de sofisticación. Están altamente automatizados, utilizan un reducido volumen de muestra, requieren un mantenimiento preventivo y de rutina mínimo y han eliminado o automatizado las calibraciones. Estas mejoras han sido facilitadas por los avances en la estabilización de los reactivos, en el desarrollo y miniaturización de electrodos y biosensores, en la capacidad para producir dispositivos desechables, precisos y no excesivamente costosos, y en el desarrollo de la microelectrónica y microcomputadores. Todos estos logros en el campo de la ingeniería y tecnología han permitido reformular los reactivos actuales hacia diferentes formatos, la incorporación del control a tiempo real de los procesos y el monitoreo del análisis, la codificación de la información en el sistema mediante códigos de barras o microprocesadores (datos de calibración, números de lote, nombre la prueba). La aplicación de estos avances tecnológicos y mejoras en los procesos ha producido una transferencia de la responsabilidad de la calidad del resultado hacia el fabricante.

La mayoría, pero no todas las características del instrumento ideal para un sistema de PLAP que están enumeradas en la Tabla 17-7 son reunidas por algunos de los sistemas comerciales actuales. Estas incluyen la grabación automática de los resultados de los pacientes, de resultados y registros de CC/AC, mantenimiento, comentarios e identificación del operador. El sistema puede quedar bloqueado en tanto no se realce el CC, o bien si este está fuera de rango, o cuando no se ha introducido la identificación del operador o del paciente. Sin embargo, no todos los sistemas tienen la capacidad de transmitir los datos al sistema de información del laboratorio. La integración de los datos obtenidos en la historia clínica es importante.

La mayor parte de los instrumentos requieren unos cuantos microlitros de sangre total, el analizador realiza la determinación directamente sobre la sangre total o bien internamente separa los eritrocitos y analiza al plasma obtenido. Cuando es preciso los eritrocitos pueden ser retenidos por filtración o centrifugación. La Tabla 17-9 presenta las tecnologías que actualmente se utilizan en los sistemas instrumentales de PLAP. La tecnología mas común hoy día es la basada en fotómetros de reflectancia. Se presenta el nombre de dispositivos que representan las diversas tecnologías y formatos, junto con otras características de los sistemas de determinación. Algunos de ellos emplean novedosos conceptos analíticos, como biosensores, paramagnetismo e inmunoensayos ópticos. Otros instrumentos del sitio de atención al paciente se aprovechan de los avances previamente señalados y son versiones en miniatura de los analizadores tradicionales de laboratorio utilizando los mismos fundamentos químicos (ver capítulo 16, p. 309).

La posibilidad de realizar la determinación con un volumen de sangre de pocos mililitros disminuye las pérdidas iatrogénicas de sangre y constituye otro importante beneficio de las PLAP. Las PLAP no invasivas, como es el uso de oxímetros de pulsera para la medición de la saturación por O₂, PCO₂, y la determinación de PO₂/PCO₂ transcutánea o conjuntiva, elimina la necesidad de una toma sanguínea. Sin embargo, dado que estos sistemas no



proporcionan una gran exactitud, se suelen emplear para evaluar tendencias, permitiendo un monitoreo continuo de información y la capacidad de reconocer cambios del estado fisiológico. Otras ventajas de los sistemas no invasivos son que producen menos problemas de infecciones y facilitan un mejor cumplimiento en el propio monitoreo debido a eliminar las molestias de múltiples punciones en el dedo. Actualmente se están desarrollando sistemas que utilizan espectroscopia infrarroja o infrarrojo cercano con análisis de firma y tecnologías fotoacústicas.

Control de calidad en los dispositivos de uso único

Tradicionalmente el control de calidad se ha realizado analizando dentro de cada serie analítica diversas concentraciones de especímenes estabilizados y matriz parecida (materiales de control, ver Capítulo 21). Tras aplicar reglas estadísticas (por ejemplo 2SD), a los resultados obtenidos se determina si la serie está "bajo control" y entonces pueden validarse los resultados de los pacientes. Según definición del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) e incorporada en las normas del CLIA'88 una serie analítica en términos de control de calidad es "un intervalo" (ya sea un período de tiempo o un número de mediciones) dentro del cual la exactitud y la precisión de la medida deben ser estables. Su mayor tamaño se establece en 24 horas. El concepto de tamaño de la serie no tiene lugar si utilizamos dispositivos o consumibles de un solo uso, pues estrictamente hablando cada determinación es una serie en sí misma. En los sistemas de PLAP basados en instrumento, cada vez que se analiza una nueva unidad (cartucho, paquete, tira, etc.) se está creando un nuevo sistema. Por esto el CC en las PLAP debe tener características diferentes a las de los sistemas tradicionales.

¿Con qué frecuencia pueden ser evaluados los sistemas de PLAP para que la calidad de los resultados generados se garantice de modo continuo?. En ciertos sistemas no basados en instrumentos, el control de calidad se integra directamente en el dispositivo a través de indicadores visuales que determinan las zonas de reacción positiva y negativa así como el flujo o llegada de la muestra a la zona de reacción. Con esta manera de trabajo, los materiales de control solo deberían analizarse al recibir un pedido y posteriormente con una regularidad que dependerá del sistema.

El CC se ha integrado en varios instrumentos de PLAP mediante la incorporación de:

- ♦ Las funciones de calibración automáticas
- ♦ Codificación (por códigos de barras o microprocesador) en las unidades de la información fundamental relativa al CC y AC
- ♦ Monitoreo al tiempo real del proceso
- ♦ Inclusión de soluciones de calibración en las unidades que utilizan sistemas con electrodos

A través de estos medios la compañía asegura la confiabilidad de los resultados de las pruebas en tanto los dispositivos hayan sido almacenados correctamente y utilizados anteriormente a la fecha de caducidad. Así, parte del CC del laboratorio dependerá de la capacidad del fabricante en manufacturar productos confiables y reproducibles.

Un instrumento analítico puede ser dividido en tres secciones, mecánico/electrónica, analítica y reactivos/calibradores. La mecánico/electrónica se compone de bombas,



engranajes, palancas, cadenas, microprocesadores de memoria, circuitos lógicos y software. Los componentes analíticos son las partes del sistema que estarán en contacto con la muestra a analizar o bien producirán la señal para que electrónicamente sea traducida en resultados. A este grupo pertenecen los electrodos selectivos de gases, electrolitos, biosensores, copas de reacción y óptica. Sin embargo, en los sistemas de PLAP los componentes mecánico/electrónicos y los analíticos han sido separados completamente de los reactivos/calibradores. En determinados sistemas los componentes analíticos se envasan individualmente con los reactivos y calibradores. Con estos dispositivos la única parte constante entre análisis es el componente mecánico /electrónico pues los biosensores, electrodos, reactivos, y calibradores son sustituidos en cada análisis.

Los programas tradicionales de CC validan el sistema completo, no sus componentes. Sin embargo con los avances electrónicos y de software es posible aislar unos subcomponentes de otros y chequearlos independientemente. Consecuentemente se puede diseñar un programa de CC específico para instrumentos de PLAP que sea superior en términos de costo-eficacia a los sistemas tradicionales. El funcionamiento mecánico electrónico de cada subcomponente debe ser comprobado diariamente, es decir al menos una vez cada 24 horas. Hay tiras estándar para reflectancia con rangos establecidos de los valores aceptables. Estas tiras se utilizan en los sistemas de fotometría de reflectancia para validar las prestaciones ópticas. También existen módulos electrónicos que se insertan en los sistemas de PLAP y simulan el comportamiento de un cartucho a una o más concentraciones. Además el módulo electrónico puede realizar una serie de pruebas mecánicas y electrónicas de la unidad básica. La comparación de varios resultados con los límites predefinidos permite al analista determinar si el sistema está trabajando correctamente. Mas aún, en determinados sistemas el módulo de prueba electrónico no sólo es un objeto pasivo sino que precisa de la intervención del operador para que se puedan realizar análisis de muestras posteriores. Este comportamiento añade un valor adicional al manejo del operador.

Se puede verificar la fiabilidad de los cartuchos reactivos, o sea del componente analítico/ reactivo/calibrador mediante el análisis con los cartuchos de materiales de control con matriz similar a las muestras. Debido a que las características de funcionamiento de las unidades se verifican con el módulo electrónico, es necesario sólo verificar las prestaciones de los cartuchos con una unidad de cada lote. Utilizando el chequeo electrónico y el material de CC se puede asegurar con un mínimo consumo de cartuchos que todos están controlados. La estabilidad y fiabilidad de los cartuchos está unida a que el almacenamiento se haga bajo adecuadas condiciones de temperatura, humedad y luz. Cada lugar de almacenamiento debe mantener su propio suministro de reactivos y realizar el CC de cada lote almacenado.

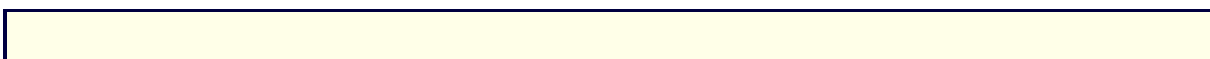
Las características de algunos instrumentos empleados en PLAP permiten detectar alteraciones de las reacciones o de la respuesta de los biosensores. El software permite el monitoreo de la rehidratación, calibraciones y respuesta analítica de cada biosensor. Cuando alguno de los parámetros cae fuera de los límites aceptables, los resultados derivados del biosensor se suprimen automáticamente. El analizador Pico lo posee en el rotor un reactivo enzimático que es sensible a la temperatura, luz y la humedad. Si la actividad enzimática no es lo suficientemente grande, puede asumirse que el medio donde estaba el rotor se ha visto afectado y la serie analítica es detenida. A medida que se extienden los procesos de control al tiempo real en los instrumentos de PLAP, disminuyen las necesidades de un CC externo. Mas aún, la definición de realizar un proceso de CC en una serie puede adaptarse a plazos



superiores a las 24 horas o incluso llegar a ser eliminada completamente en sistemas que lleven incorporados procesos e control.

Bibliografía

- Chernow B: The bedside laboratory: a critical step forward in ICU care, *Chest* 97:183S-184S, 1990.
- Claremont DJ: Biosensors: clinical requirements and scientific promise, *J Med Engl Technol* 11:51-56, 1987.
- Department of Health and Human Services, Health Care Financing Administration: Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988; final rule, *Fed Register* 7:7002-7186, 1992.
- Despotis GJ, Gresalfi NJ, Enney-O'Mara LA, et al: Prospective evaluation and clinical utility of on-site coagulation monitoring in cardiac surgical patients, *J Thorac Cardiovasc Surg* 107:271-279, 1994.
- Fleisher M, Schwartz MK: Strategies of organization and service for the critical-care laboratory, *Clin Chem* 36:1557B-1561B, 1990.
- Friedman BA, Mitchell W: Integrating information from decentralized laboratory testing sites, *Am J Clin Pathol* 99:637-642, 1993.
- Handorf CR: Quality control and quality management of alternate-site testing, *Clin Lab Med* 14:539-558, 1994.
- Handorf CR: POC testing: must quality cost more?, *Med Lab Observer* 25(9S):28-33, 1993.
- Jacobs E, Sarkozi L, Coleman N: A centralized critical care (stat) laboratory: the Mount Sinai experience, *Crit Care Rep* 2:397-405, 1991.
- Jacobs E, Vadasdi E, Sarkozi L, Coleman N: Analytical evaluation of i-Stat portable clinical analyzer and use by non-laboratory healthcare professionals, *Clin Chem* 39:1069-1074, 1993.
- Jacobs E: Total quality management and point-of-care testing, *Med Lab Observer* 25(9S):2-6, 1993.
- Jacobs E: Bedside glucose testing: sources of variation, *ASCP Check Sample-Core Analytes* 10:1-11, 1994 (American Society of Clinical Pathologists).
- Kost JG, Jammal MA, Ward RE, Safwat AM: Monitoring of ionized calcium during human hepatic transplantation: critical values and their relevance to cardiac and hemodynamic management, *Am J Clin Pathol* 86:61-70, 1986.
- Kost JG: The hybrid laboratory: shifting the focus to the point of care, *Med Lab Observer* 24(9S):17-28, 1992.
- Korpman RA: Health care information systems\ Mpatient centered integration is the key, *Clin Lab Med* 11:203-220, 1991.
- Lee-Lewandowski E, Laposata M, Eschenbach K, et al: Utilization and cost analysis of bedside capillary glucose testing: implications for managing point of care testing, *Am J Med* 97:222-230, 1994.
- Marks V: Advantages and disadvantages of performing clinical biochemistry nearer the patient. In Zinder O, editor: *Optimal use of the laboratory*, New York, 1986, Karger.
- Nanji AA, Poon R, Hinberg I: Near-patient testing: quality of laboratory test results obtained by non- technical personnel in a decentralized setting, *Am J Clin Pathol* 89:797-801, 1988.
- NCCLS Approved Guideline C30-A: *Ancillary (bedside) testing in acute and chronic care facilities*, Villanova, Penn., June 1994, National Committee for Clinical Laboratory Standards.
- Rock RC: Why testing is being moved to the site of patient care, *Med Lab Observer* 23(9S):2-5, 1991.
- Robinson MR, Eaton RP, Haaland DM, et al: Noninvasive glucose monitoring in diabetic patients: a preliminary evaluation, *Clin Chem* 38:1618-1622, 1992.
- Salem M, Chernow B, Burke R, et al: Bedside diagnostic testing: its accuracy, rapidity, and utility in blood conservation, *JAMA* 266:382-389, 1991.
- Suver JD, Neumann BR, Boles EE: Accounting for the costs of



quality, *Health Finance Management* 9:29- 37, 1992.
Winkelman JW, Wybenga DR, Tanasijevic MJ: The fiscal consequences
of central vs. distributed testing of glucose, *Clin Chem* 40:1628-1630, 1994.

Tablas

Tabla 17-1. Denominaciones para las PLAP.

Pruebas realizadas en localizaciones alternativas
Pruebas auxiliares
Pruebas realizadas en la cabecera del paciente
Pruebas descentralizadas
Pruebas distribuidas
Pruebas realizadas cerca del paciente
Pruebas enfocadas hacia el paciente
Pruebas de valor añadido
Pruebas dispensadas (waived testing)

Tabla 17-2. Beneficios potenciales del sistema de PLAP.

Para el medico:	Mejoría de tiempo de respuesta terapéutico
Para pacientes:	Sistema enfocado hacia el paciente Menos traumático (por punción de un dedo) Mas práctico
Para el laboratorio:	Menor extracción de sangre Disminución de errores analíticos Mejoría en visibilidad Disminución de mano de obra Colaboración con médicos Participación directa del paciente Manejo del sistema por equipo
Para la administración:	Disminución de la estancia en unidades de cuidados intensivos Disminución general de las estancias Ahorros financieros Programa de manejo total de la calidad.

Tabla 17-3. Pruebas dispensadas (CLIA'88).



Urianálisis mediante tabletas o tiras reactivas (no automatizado) para bilirrubinas,
glucosa, hemoglobina cetonas, leucocitos, nitritos, pH, proteínas, gravedad específica, y urobilinógeno
Sangre oculta en heces
Prueba de ovulación (por comparación visual de color)
Prueba de embarazo en orina (por comparación visual de color)
Velocidad de sedimentación globular
Hemoglobina (sulfato de cobre)
Glucosa en sangre (aprobado por la FDA para uso en domicilio)
Hematocrito por centrifugación
Hemoglobina automatizada usando analizadores de único constituyente, en cuyo interior se producen la reacción con la muestra, la medición y lectura del resultado.

Tabla 17-4. Agenda del programa de entrenamiento para PLAP.

Teoría acerca del instrumento/dispositivo
Obtención y conservación de los especímenes
Mantenimiento del instrumento
Procedimientos de control de calidad
Procedimientos analíticos
Fuentes y magnitud de los errores preanalíticos
Significación clínica

Tabla 17-5. PLAP como proyecto en la gestión total de la calidad.

Enfoque multidisciplinario
Ver al sistema completo en lugar del desempeño individual
Evaluación y refinamiento constantes
Mejoría en las prestaciones de los servicios de laboratorio en los cuidados críticos
Reducción de costos



Tabla 17-6. Monitoreo de la garantía de la calidad de las PLAP.

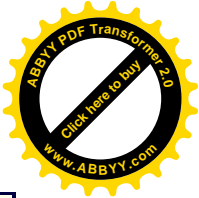
Frecuencia	Función
Diariamente	Observar el cumplimiento y el desarrollo del trabajo
Mensualmente	Producir y distribuir los informes de CC/AC La persona responsable efectúa un chequeo de AC en cada lugar de PLAP
Bimensualmente	Reuniones del comité de usuarios finales
Semianualmente	Reunión del comité interdisciplinario

Tabla 17-7. Características ideales de un sistema de PLAP.

Ser portátil y en si mismo independiente
Disponer de un menú de pruebas flexible
Fácil de manejar; requerir un entrenamiento mínimo
Requerir mínimos volúmenes de sangre total
Prestaciones de exactitud y precisión semejantes a las de los sistemas de laboratorio central
Calibraciones automáticas y periódicas
Requerir mínimos mantenimientos tanto preventivos como de rutina
Tener códigos de barras en los reactivos y controles y poder leer códigos de barras en los especímenes
Reactivos estables si se almacenan a temperatura ambiente
Posibilidad de impresión
Posibilidad de conexión con el sistema informático del laboratorio
Proporcionar software para AC, bloqueos de sistemas y gestión de datos

Tabla 17-8. Tecnología no basada en instrumentos empleada en PLAP.

Tipo de ensayo	Principio del ensayo	Formato Espécimen	Prueba
----------------	----------------------	-------------------	--------



Cualitativo	Reacciones químicas	Tiras de papel	Heces impregnadas	Sangre oculta
HCG, estreptomicina A	Inmunoconcentración	Cartuchos secos (un solo uso)	Orina y suero	
Drogas de abuso	Inmunoensayo competitivo	Cartuchos secos (un solo uso)	Orina	
Madurez pulmonar fetal		Aglutinación de látex en porta	Líquido amniótico	
CC-MB, Troponina I, Mioglobina,	Inmunocromatográfico	Cartuchos secos (un solo uso)	Sangre	y T
		Cartuchos secos (un solo uso)	Orina	hGC
Clamidias, estreptomicina		Cartuchos secos (un solo uso)	Torundas	
Herpes				A,
Semicuantitativo	Reacciones químicas/	Tiras de papel	Orina	
Urianálisis	enzimáticas	impregnadas		
Glucosa		Tiras de papel impregnadas	Sangre	
Etanol		Cartuchos secos (un solo uso)	Saliva	
Cuantitativo	Reacciones químicas/	Cartuchos secos	Sangre	
Lípidos	enzimáticas	(un solo uso)		
	Inmunocromatográfico	Cartuchos secos	Sangre	



Fármacos terapéuticos	(un solo uso)
CC-MB, Creatina cinasa-MB; HGC, gonadotropina coriónica	

Tabla 17-9. Tecnología actual empleada en PLAP basadas en un sólo instrumento.

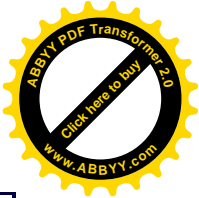
TECNOLOGÍA: Fotometría, reflectante	
Formato: único	Tiras de reactivos secos de uso
Tipo de muestra:	Sangre total
Precisión de pipeteo:	No
Volumen de muestra (µL):	10.0-45.0
Sistema representativo:	Glucómetros
Pruebas:	Glucosa
Tipo de muestra:	Suero/plasma
Precisión de pipeteo:	No
Volumen de muestra (µL):	30
Sistema representativo:	Reflotron (Boehringer)
Pruebas:	Química y MDT
Precisión de pipeteo:	Si
Volumen de muestra (µL):	10
Sistema representativo:	Ektakem (J & J)
Pruebas:	Química
TECNOLOGÍA: Fotometría, transmitancia	
Formato: uso único	Cartuchos de reactivos líquidos de
Tipo de muestra:	Sangre total
Precisión de pipeteo:	No
Volumen de muestra(µL):	(~20)
Sistema representativo:	Vision (Abbot)
Pruebas:	Química
Tipo de muestra:	Suero/plasma
Precisión de pipeteo:	No
Volumen de muestra(µL):	2 gotas
Sistema representativo:	Biotrack (Boehringer)
Pruebas:	Drogas
Formato:	Cartuchos de reactivos secos de uso



único	Tipo de muestra: Precisión de pipeteo: Volumen de muestra(μL): Sistema representativo: Pruebas:	Sangre total No 10 HemoCue (HemoCue) Glucosa y hemoglobina
uso	Formato: Tipo de muestra: Precisión de pipeteo: Volumen de muestra(μL): Sistema representativo: Pruebas:	Rotores de reactivos secos, multiple Sangre total No ~ 90 Picolo (Abaxis) Química
	Tipo de muestra: Precisión de pipeteo: Volumen de muestra(μL): Sistema representativo: Pruebas:	Suero/plasma No 90 Analyst (DuPont) Química
TECNOLOGÍA: Fluorometría		
múltiple uso	Formato: Tipo de muestra: Precisión de pipeteo: Volumen de muestra (μL): Sistema representativo: Pruebas:	Cartuchos de reactivos secos Suero No 20 IOS (Biocircuits) Hormonas
TECNOLOGÍA: Potenciometría/electroquímica		
	Formato: Tipo de muestra: Precisión de pipeteo: Volumen de muestra (μL): Sistema representativo: Pruebas:	Biosensores en tira, uso único Sangre total No 10 Satellite G (Medisence) Glucosa
	Precisión de pipeteo: Volumen de muestra (μL): Sistema representativo:	No 10 AccuCheck (Boehringer)
múltiples	Formato: Tipo de muestra: Precisión de pipeteo: Volumen de muestra (μL): Sistema representativo: Pruebas:	Biosensores en chips, pruebas Sangre total No ~70 PCA (i-Stat) Química, gases en sangre



Precisión de pipeteo:	No
Volumen de muestra (µL):	500
Sistema representativo:	IRMA (Diametrics)
Pruebas:	Química, gases en sangre
Formato:	Electrodos en miniatura, pruebas multiples,
uso multiple	
Tipo de muestra:	Sangre total
Precisión de pipeteo:	No
Volumen de muestra (µL):	200
Sistema representativo:	Gem Stat/Premier (Mallinckrodt Sensor Systems)
TECNOLOGÍA:	Turbidimetría
Formato:	Seca, cartuchos de particulas de
látex, uso único	
Tipo de muestra:	Sangre total
Precisión de pipeteo:	No
Volumen de muestra(µL):	10
Sistema representativo:	DCA 2000 (Bayer)
Pruebas:	Hemoglobina A1c
TECNOLOGÍA:	Detección de movimiento óptico
Formato:	Seca, tarjeta de reactivo
paramagnética	
	de partículas en movimiento, uso
único	
Tipo de muestra:	Sangre total
Precisión de pipeteo:	No
Volumen de muestra(µL):	1 gota grande
Sistema representativo:	TAS (Cardiovascular Diagnostics)
Pruebas:	Coagulación
Formato:	Seca, cartuchos de muestreo en
movimiento	
Tipo de muestra:	Sangre total
Precisión de pipeteo:	No
Volumen de muestra(µL):	1 gota grande
Sistema representativo:	Biotrack (Boehringer)
Pruebas:	Coagulación
Precisión de pipeteo:	No
Sistema representativo:	Hemochron Jr (International Technidyne)
Pruebas:	Coagulación
TECNOLOGÍA:	Luminiscencia/fibra óptica
Formato:	Catéter intra-arterial



Tipo de muestra:	Sin aplicación
Precisión de pipeteo:	Sin aplicación
Volumen de muestra(μL):	Sin aplicación
Sistema representativo:	PB3300 (Puritan Bennett)
Pruebas:	Gases en sangre
<i>MDT</i> , Monitoreo de drogas terapéuticas	

CAPÍTULO 18

18. Sistemas de Información de Laboratorio

David Chou

Características del SIL

- Funciones generales
- Datos demográficos del paciente
- Entrada de peticiones
- Identificación de las muestras
- Flebotomía
- Transporte y seguimiento de las muestras
- Conexión con los instrumentos analíticos
- Validación de los datos
- Entrada de resultados
- Informes
- Control de calidad
- Garantía de calidad
- Informes de gestión

Tecnología del SIL

- Hardware
- Sistemas operativos
- Lenguajes de programación
- Gestores de bases de datos
- Redes informáticas

Otros aspectos del SIL

- Mantenimiento
- Seguridad y privacidad de los datos
- Regulaciones legales
- Papel del SIL en hospitales informatizados
- Desarrollo de estándares e intercambio de datos
- Proyecciones de futuro



OBJETIVOS

- ♦ Describir las funciones, operación, y flujo de trabajo de un sistema de información de laboratorio (SIL) en un laboratorio clínico.
- ♦ Describir los problemas, importancia y necesidades de conexión con los instrumentos y los ordenadores y el intercambio de información y datos entre ordenadores.
- ♦ Describir la terminología básica del ordenador y de la tecnología asociada con los sistemas de información del laboratorio.
- ♦ Describir el tipo de información generado por el SIL, que puede utilizarse para realizar un seguimiento de la calidad de la atención médica del hospital.

Términos Clave

ABT (admisiones /bajas/ transferencias) Información administrativa y demográfica del paciente facilitada por un ordenador central. Esta información suele hacer referencia a admisiones, transferencias y bajas de pacientes.

bases de datos en red Diseño de base de datos que intenta mantener una única copia de datos utilizando índices complejos o punteros hacia los datos.

bases de datos jerárquicas Diseño de base de datos que trata los datos de forma jerárquica o ramificada "en forma de árbol".

bases de datos relacionales Diseño de base de datos definido por E.F.Codd basado en la teoría de conjuntos. Las operaciones permitidas en una base de datos relacional son similares a las permitidas en un conjunto. Esta base de datos permite recuperar la información como está relacionada (en conjuntos), no como un archivo donde solo puede recuperarse la información contenida en el archivo.

cliente/servidor Diseño de sistema donde dos o más computadores comparten el proceso de datos. La información almacenada en el ordenador "servidor" es descargada al ordenador "cliente" para su procesamiento independiente. Cuando los datos procesados se cargan, se invierte el proceso.

código de barras Serie de líneas paralelas de distinto grosor, impresos de forma que representan números o números y letras y pueden ser leídos por equipos automáticos.

conexión Programa o programas que permiten que dos ordenadores intercambien datos electrónicamente.

conexión bidireccional Programa que facilita la comunicación electrónica entre un instrumento y un SIL, permitiendo el intercambio de información en ambas direcciones.

conexión unidireccional Programa que permite la comunicación electrónica entre un SIL y un instrumento, permitiendo que el instrumento envíe o reciba información del SIL.

copia de (Back-up) Procedimiento, realizado generalmente a diario, en el que los datos operativos de los discos se transfieren a un medio secundario, habitualmente una cinta magnética. Normalmente los datos de estas cintas se copian al disco, solo si falla el disco en operación.

datos archivados Datos de pacientes eliminados del acceso directo en el sistema SIL y



almacenados de forma que no son accesibles directamente por el usuario, requiriendo la intervención de un operador informático.

datos demográficos del paciente Información clínica y administrativa del paciente obtenidos en el momento de su admisión. Incluye el número de paciente, nombre, sexo, edad, fecha de nacimiento y cualquier otra información relacionada con el paciente. Esta información define e identifica al paciente en el sistema.

revisión delta Método de control de calidad por el que un resultado actual de un paciente es comparado con un resultado previo.

en línea (On-line) Datos mantenidos en un ordenador de manera que permita su acceso inmediato.

entrada de peticiones Acción de entrar peticiones de análisis en un sistema computerizado. Este proceso puede realizarse en el SIL o en un ordenador separado vinculado al SIL.

estructura de los datos Organización de los datos almacenados en el computador.

gestor de bases de datos Programa diseñado para gestionar el almacenamiento y recuperación de datos desde y hacia los sistemas de almacenamiento del computador como los discos o cintas.

hardware Estructura física del computador. El hardware no sufre grandes cambios después de su fabricación.

informe acumulativo Informe diseñado para mostrar los resultados de un paciente en forma tabulada, a lo largo de un período de tiempo.

informes interpretados Informes que facilitan una información al clínico que varía dependiendo de los resultados, y describe posibles tratamientos o posibilidades diagnósticas para el conjunto de resultados obtenidos.

lenguajes de programación Conjunto estructurado de instrucciones diseñado para ser traducido a instrucciones detalladas para el hardware. La mayoría de los lenguajes son similares al inglés y están diseñados para facilitar la introducción de instrucciones para el ordenador.

listado de pendientes Informe impreso por el SIL enumerando las muestras y pruebas que aun no han sido procesadas. Puede imprimirse una lista de pendientes para cada tarea desarrollada en el laboratorio.

listas de trabajo Lista de números de muestras generada por un técnico antes de realizar una tarea específica, como una serie analítica o una extracción de muestras.

mantenimiento de archivos Programa ejecutado regularmente para gestionar y reorganizar los datos, generalmente en discos, para optimizar su almacenamiento y recuperación.

mantenimiento del software Cambios en el software destinados a solucionar problemas, mejorar la funcionalidad, o introducir nuevas capacidades.

miniordenador Ordenador caracterizado por un rango de costos entre U\$25.000 y U\$500.000 y que con frecuencia da soporte a nivel departamental.

número de muestra Número asignado por el SIL a una muestra, normalmente de 4 a 10 dígitos de longitud, con el fin de identificarla. El número puede ser reutilizado periódicamente y no debe duplicarse mientras la muestra aún está siendo procesada.

ordenador central Ordenador caracterizado por un costo que excede los U\$500.000 y que da soporte a varios departamentos. Generalmente requiere una instalación eléctrica especial y aire acondicionado.



ordenador personal Ordenador de sobremesa diseñado para ser usado por un único usuario en la oficina o en su casa, con un costo que oscila entre U\$1000 y U\$5.000.

petición duplicada La misma prueba ordenada en un plazo corto de tiempo que puede ser o no necesaria para la atención del paciente.

programa Serie de instrucciones que dirigen al hardware de la ordenador a la realización de acciones específicas.

programas de la aplicación Programas escritos para soportar funciones específicas del usuario final, como el ABT (anteriormente citado). Las interacciones con el ordenador visibles para la mayoría de los usuarios son las de los programas de la aplicación.

red de área amplia (WAN) Red digital de ordenadores que presta servicio a un área mayor de 1 o 2 millas de distancia. Las WAN normalmente son redes que proveen servicios interurbanos.

red de área local (LAN) Red digital de ordenadores que da servicio a un área localizada, generalmente limitada a unas pocas millas de distancia.

red informática digital Utilización de televisión por cable, microondas o tecnología de fibra óptica para permitir comunicaciones más rápidas entre un grupo de ordenadores.

serie Definida por el Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988 (CLIA'88), una serie es un intervalo dentro del cual se espera que la exactitud y precisión de un sistema analítico sean estables pero que no puede superar las 24 horas.

sistema de información del laboratorio (SIL) Una o varias aplicaciones informáticas, el sistema operativo asociado y el hardware necesario para ejecutar programas informáticos que cubran las necesidades operativas y de gestión de un laboratorio clínico.

sistema operativo Software diseñado para supervisar la ejecución ordenada de los programas y dar apoyo a las funciones básicas utilizadas por la mayoría de los programas.

software Conjunto de programas que funcionan en el ordenador.

tiempo improductivo Cualquier periodo de tiempo en el que un sistema informático no está disponible para su utilización.

unidad central de procesamiento (CPU) Parte del ordenador responsable de la ejecución de programas y de la toma de decisiones (el cerebro del computador).

validación Proceso mediante el cual un técnico revisa uno o más análisis y deja pasar los resultados al archivo del paciente para ser informados.

virus Programa de naturaleza frecuentemente destructiva, diseñado para incluirse en el sistema operativo u otro software comúnmente accesible.

La función del laboratorio es facilitar información a los médicos. Esta información está normalmente en forma de datos derivados del análisis de las muestras de los pacientes. Esta transferencia de información requiere que estos datos se integren con la base de datos completa del paciente. Para realizar la transferencia de información de forma rápida y eficiente, es necesario un sistema de información computerizado, denominado sistema de información de laboratorio.

El *sistema de información de laboratorio* o *SIL*, puede definirse como una o varias aplicaciones informáticas, junto con el programa del sistema operativo asociado y el hardware necesario para ejecutar programas informáticos que soporten las necesidades operativas y la



gestión del laboratorio clínico. Dado que el espectro de servicios requeridos por un SIL puede diferir significativamente de un laboratorio a otro, tanto el software como el hardware pueden variar significativamente. La mayoría de los sistemas de información que han tenido mas éxito, estructuran las tareas de rutina y ayudan a integrar diversos procesos.

Adicionalmente, el SIL facilita datos para la gestión e impone controles administrativos. Por tanto un SIL, debe estar estrechamente sintonizado con las necesidades operativas de cada laboratorio y su organización. El ordenador puede ser una poderosa herramienta para mejorar tanto la productividad como la calidad, y, a diferencia de un instrumento automático, que afecta principalmente al técnico que lo maneja, el SIL influye directamente en casi todo el personal del laboratorio y en muchos usuarios fuera del laboratorio.

La mayoría de SILs se basan en la unión de tecnologías suministradas por dos o más proveedores. Cada proveedor en la cadena tecnológica construye sobre productos y sistemas desarrollados por otros proveedores. En el nivel más alto de esta cadena está el software denominado *aplicación informática*. Este es el producto final reconocido como un SIL por la mayoría de usuarios. El proveedor que desarrolla actualmente un SIL escribe los programas de las aplicaciones utilizando el segundo nivel de la cadena tecnológica. Este consiste en herramientas de desarrollo de programas tales como el *gestor de la base de datos*, el o los *lenguajes de programación*, y el *sistema operativo*. Dichas herramientas son suministradas normalmente por uno o más proveedores que no están relacionados con el proveedor de aplicaciones informáticas de SIL. Finalmente, un proveedor suministra el *hardware*, u ordenador físico que ejecuta el programa. Dada la estrecha relación entre el hardware y el sistema operativo, ambos son suministrados normalmente por un mismo proveedor. Un único proveedor minimiza la posibilidad de que un problema con el programa de SIL puede estar relacionado con un defecto en el sistema operativo desarrollado por otro proveedor. La utilización de más de un proveedor permite al usuario disociar los cambios en el programa de la aplicación de los cambios en el hardware.

Características del Sil

Funciones generales

En los últimos años, los SIL presentes en el mercado se han ido estandarizando progresivamente. La mayoría de los sistemas contienen módulos que dan soporte a tareas como la recogida de muestras, entrada de peticiones, entrada manual de resultados, informes de resultados, y conexión con instrumentos automáticos y ordenadores (ver cuadro). Hay módulos adicionales normalmente incluidos que facilitan informes de gestión y otros informes específicos. Los SILs para hospitales dan soporte a la flebotomía mediante las listas de extracción de sangre, la capacidad de imprimir etiquetas, y otras tareas organizativas esenciales. Los sistemas para laboratorios privados normalmente incluyen también un seguimiento de las muestras y funciones financieras y de facturación. La distribución del SIL en módulos se ha hecho por razones funcionales y de marketing. Normalmente uno de estos módulos da soporte a las funciones del laboratorio general para áreas de gran volumen de pruebas que producen respuestas numéricas, como hematología y bioquímica. Otros módulos dan soporte a microbiología, banco de sangre, y anatomía patológica. Las grandes instituciones pueden utilizar dos o más proveedores de SIL para cubrir sus necesidades. En



estos casos, un proveedor puede suministrar un sistema para cubrir las necesidades funcionales del laboratorio general, mientras que otro proveedor da soporte a una o más áreas adicionales como banco de sangre, anatomía patológica, o facturación de clientes. Muchos proveedores de SIL conectan con programas de banco de sangre de terceros para minimizar las regulaciones obligatorias de la Food and Drug Administration (FDA). Las secciones siguientes cubren aspectos de un SIL que da soporte al proceso de análisis de muestras en áreas del laboratorio general.

Funciones del SIL
Preanalíticas Solicitud de pruebas Listas de extracción Flebotomía (etiquetas, tiempos de extracción) Identificación de la muestra y separación de alícuotas Seguimiento de muestras
Analíticas Listas de trabajo manuales Listas de trabajo de los instrumentos Entrada manual de resultados Entrada automática de resultados por conexión on-line Control de revisión delta Control de calidad Validación de resultados
Postanalíticas Informes de pacientes no acumulativos Informes acumulativos de pacientes Impresión remota inmediata de informes Consulta electrónica de resultados Archivo histórico de pacientes Registro de la carga de trabajo Corrección de resultados Facturación

Datos demográficos del paciente

Antes de poder solicitar cualquier prueba, el paciente debe ser identificado y definido en el sistema. La mayoría de los hospitales asignan con este fin un número único, permanente de identificación de paciente. Este número combinado con otra información relacionada con el paciente se denomina *información demográfica del paciente*. Los sistemas de laboratorios de referencia o de programas externos pueden definir los pacientes bajo los auspicios del cliente que envía las pruebas. La información demográfica puede ser introducida manualmente



por un administrativo en el SIL. Alternativamente, una conexión entre el SIL y el ABT (altas, bajas, y transferencias) del ordenador del sistema administrativo, permite que la información se transmita al SIL cuando se necesite, durante el proceso de solicitud de pruebas o que se transmita automáticamente al ingresar el paciente en cualquier parte del hospital. Las conexiones automatizadas con el ABT pueden reducir significativamente los errores y el tiempo de entrada asociado con la introducción manual de datos. La información demográfica introducida en este momento incluye (1) el número de paciente (que puede ser el número de seguridad social), (2) nombre del paciente, (3) sexo, (4) edad o fecha de nacimiento, (5) raza, (6) médico responsable que recibirá los informes, y (7) diagnóstico de ingreso. Muchos sistemas capturan también información sobre el paciente como la altura y el peso, así como información para la facturación y la contabilidad. Si no puede determinarse el número de un paciente, como cuando se trata de un paciente accidentado inconsciente, atendido en una sala de urgencias, el laboratorio puede asignar un número temporal y un seudónimo. La información temporal del paciente debe cambiarse más tarde y combinarse en un registro con la información adecuada del paciente.

Entrada de peticiones

Después de la entrada del paciente, la próxima interacción del SIL es generalmente el procesamiento de una solicitud de pruebas, también conocido como *entrada de peticiones*. Las peticiones pueden ser recibidas por el SIL mediante una conexión ordenador a ordenador, por ejemplo, con el sistema de información del hospital (SIH), desde donde pueden ordenar directamente la prueba el personal de enfermería o los médicos.^{ref(299)} Alternativamente, el laboratorio recibe un volante de petición de un área clínica, y el personal del laboratorio entra las pruebas solicitadas en el SIL. Normalmente, la entrada de la petición requiere la introducción de la información enumerada en el cuadro siguiente. Este proceso se conoce como *entrada de datos*.

El SIL realiza numerosos controles como parte del proceso de entrada de datos. La mayoría de los sistemas mantienen tablas internas que contienen listas del personal autorizado para entrar pruebas, médicos, ubicaciones de pacientes, pruebas disponibles en el laboratorio, e incluso tiempos (de respuesta) razonables. Estas tablas impiden la entrada de información errónea pero también requieren actualizaciones, conocidas como *mantenimiento de tablas*. Muchas instituciones también incorporan un dígito de control para los números de pacientes o cualquier número largo que requiera alguna forma de auto-validación. Es normalmente un dígito único incluido como parte del número de paciente que se computa durante la entrada de datos a partir de los dígitos del número de paciente. Si el número computado no coincide con el dígito de control, se rechaza la entrada del dato. Por ejemplo, si el número de paciente es 12345676 y el último dígito es el dígito de control, una manera de generar un cálculo del dígito de control es usar la fórmula:

$$\text{Dígito de control} = [2*C_1 + 3*C_2 + 4*C_3 + 5*C_4 + 6*C_5 + 7*C_6 + 2*C_7] \text{ módulo } 10$$

donde la función *módulo* es el remanente después de dividir el resultado entre 10. Por lo tanto el resultado calculado es:

$$\text{Dígito de control} = [2*(1) + 3*(2) + 4*(3) + 5*(4) + 6*(5) + 7*(6) + 2*(7)]$$



$$\begin{aligned} &= 126 \text{ módulo } 10 \\ &= 6 \end{aligned}$$

Si el administrativo escribe 22345676, el cálculo del dígito de control dará como resultado un 7. Como se espera un 6, el número de paciente es rechazado por la ordenador. Los dígitos de control no garantizan la exactitud pero sí están diseñados adecuadamente ayudan a reducir errores. En este ejemplo, las probabilidades de coincidir con el dígito de control mediante un proceso aleatorio son de 1 en 10.

Durante la etapa de entrada de peticiones, el SIL puede verificar también la existencia de peticiones duplicadas. Una *petición duplicada* se produce cuando se pide la misma prueba o panel de pruebas más de una vez dentro de un espacio de tiempo definido. El control de peticiones duplicadas es complicado, ya que cualquier control de una prueba debe investigar la petición de la prueba por sí misma y también como componente de un grupo de pruebas, como un perfil de pruebas. El intervalo permisible entre peticiones de pruebas duplicadas depende de las preferencias del médico peticionario, la ubicación del paciente, la prueba, factores económicos, y una multitud de otros factores. Por ejemplo, el intervalo para un panel duplicado de electrolitos en una unidad de cuidados intensivos podría ser menos de una hora, mientras que el tiempo para un nivel de testosterona duplicado en consultas externas podría ser de varios días. En la mayoría de las pruebas, se requiere un conocimiento de la situación clínica antes de que sea posible determinar si ha sido solicitada inapropiadamente. A menos que la petición sea realizada por el médico responsable del paciente, esta información rara vez está disponible en el momento que se solicitan las pruebas. La determinación de un intervalo apropiado para las pruebas duplicadas realizada mediante el consenso de todos los médicos peticionarios o una revisión detallada de sus prácticas, es una tarea formidable y los médicos generalmente se resisten a realizar sus propias peticiones de pruebas a causa del tiempo que requiere la tecnología actual. La mayoría de los laboratorios verifican las órdenes duplicadas solo para resolver problemas operativos y para controlar situaciones donde la misma prueba se pide accidentalmente dos veces. El control de peticiones duplicadas per se es raramente eficaz para cambiar la forma de realizar las peticiones o para intentar reducir la utilización de pruebas.

Datos Introducidos Durante el Proceso de Entrada de Una Petición
1. Identificación del paciente, número de paciente y nombre del paciente
2. Uno o varios médicos peticionarios
3. Uno o varios médicos destinatarios de los informes con su localización
4. Fecha y hora de petición de la prueba
5. Tiempo en que la muestra fue o será recogida
6. Persona que entra la petición
7. Pruebas solicitadas
8. Prioridad de las pruebas pedidas (urgencia o rutina)



9. Cualquier instrucción o comentario especial relacionado con la petición

Identificación de muestras

Si la muestra ya se ha recogido, el personal de laboratorio la registra en el SIL como recibida. En caso contrario, el ordenador pone las pruebas solicitadas en una lista para su futura recogida. En ambos casos, el SIL generará una etiqueta de identificación de muestras, que contiene los datos demográficos del paciente, la ubicación del paciente, las pruebas solicitadas, y los tipos de tubo de recogida (Fig. 18-1). La mayoría de las etiquetas de identificación de muestras incluyen también un *número de muestra*, o *número de laboratorio*, un número de identificación que permite al ordenador establecer una relación entre esta muestra, una petición de pruebas específica y un paciente. Los números de laboratorio pueden asignarse para cada extracción o, mas raramente, para cada prueba solicitada. Otro enfoque utilizado por laboratorios grandes requiere sucesiones diferentes de números de laboratorio para distintas áreas analíticas. Por ejemplo, los números entre el 100,000 y el 199,999 se reservan para bioquímica, entre el 200,000 y el 299,999 para hematología, y así sucesivamente. Para mantener los números cortos, la mayoría de los sistemas reciclan los números de laboratorio. Los sistemas que reutilizan los números de laboratorio deben verificar si un número está siendo usado con una muestra en activo antes de reasignarlo. Algunos sistemas asignan un número de laboratorio permanente combinando un código de fecha con una corta secuencia numérica. Aunque esto ofrezca la ventaja de un número de laboratorio permanente, el tamaño del número complica la entrada manual de datos. En la mayoría de los casos el SIL asigna un número de laboratorio en el momento de ser solicitadas las pruebas, pero en casos de peticiones con fecha futura este cometido puede hacerse mas adelante. Algunos sistemas permiten a los usuarios reservar números de laboratorio para su asignación manual. Aunque esto es conveniente en condiciones tales como un fallo del ordenador, la asignación manual de números de laboratorio aumenta mucho los errores, especilmente si los usuarios asignan accidentalmente el mismo número de laboratorio a muestras que no tienen relación.

El número de identificación de laboratorio se imprime normalmente en la etiqueta de identificación de la muestra como un número arábigo y se duplica frecuentemente con formato de código de barras. El *código de barras* consiste en una serie de pequeñas líneas paralelas de grosor variable que se usan para representar números o letras y números, y que pueden ser leídas por un equipo automatizado. Existen varios formatos de código de barras, pero el formato más utilizado en hospitales es el Código 39. El antiguo formato Codabar se ha utilizado para rotular productos de banco de sangre. El Codabar está limitado a la representación de números, mientras que el Código 39 puede representar caracteres numéricos y letras mayúsculas. En nuevas aplicaciones se recomienda el código 128, ya que puede representar letras minúsculas y otros caracteres no disponibles en el Código 39. La mayoría de los lectores e impresoras de código de barras actuales leen e imprimen automáticamente varios formatos. Las etiquetas de código de barras se imprimen normalmente utilizando papel térmico o una cinta termo sensible que transfiere las imágenes a la etiqueta. Los lectores de



código de barras pueden leer de forma automática como las unidades basadas en láser que se ven en supermercados, o hacerlo el usuario con un dispositivo de tipo lápiz. Los lectores automáticos de código de barras son más caros que los de tipo lápiz, pero son más fáciles de usar.

El código de barras en la etiqueta de las muestras reduce mucho los errores en la manipulación de las muestras al tiempo que aumenta la productividad.^{ref(300)} Para obtener el máximo beneficio, el código de barras de las muestras debe estar coordinado con los instrumentos automáticos, sobre todo aquellos que aspiran muestra directamente del tubo de extracción y leen el código de barras de forma automática. Las limitaciones mecánicas de los instrumentos y los tubos de extracción limitan el tamaño del código de barras. Los códigos de barras grandes se leen con mas fiabilidad, pero consumen espacio de la etiqueta y pueden impedir que se imprima información valiosa legible por el ojo humano. Dado que el número de paciente es más grande y no es único para una petición concreta, normalmente solo se imprime el número de laboratorio o una parte del mismo en el código de barras.

Flebotomía

Para aquellas muestras que van a ser recogidas mediante una programación futura, el ordenador imprime una lista de extracciones y etiquetas de identificación de muestras. Las etiquetas de identificación de muestras pueden servir también como lista de extracciones para el flebotomista. El SIL puede imprimir también la lista de extracciones con un orden que optimice el trabajo del flebotomista. Finalizada la recogida de las muestras, el flebotomista o un administrativo verifica las muestras recogidas y borra o vuelve a programar las solicitudes no realizadas en el SIL. Los ordenadores portátiles pequeños con lectores de código de barra incorporados permiten también que el flebotomista verifique la recogida a la cabecera del paciente y transmitir el estado de cada recogida al ordenador central a su regreso al laboratorio, reduciendo el tiempo para la comprobación de las extracciones y aumentando la exactitud del tiempo de extracción. Para incrementar la exactitud de la flebotomía, un código de barras en la pulsera de identificación del paciente permite que un flebotomista con un lector portátil asigne la petición de pruebas al paciente apropiado.

Transporte y seguimiento de las muestras

Después de la recogida, las muestras deben estar preparadas para su transporte o análisis. El SIL a menudo imprime etiquetas adicionales para las alícuotas u otros propósitos, como parte de la solicitud inicial o bajo demanda. Si el procesamiento tiene lugar en un centro satélite, el SIL puede seguir la muestra durante el tiempo de transporte y su localización, para ayudar a determinar el tiempo de transporte y para localizar las muestras perdidas, pero debido al esfuerzo adicional que requiere, el seguimiento no se utiliza habitualmente. El seguimiento de muestras puede ser útil en grandes laboratorios con tiempos de transporte prolongados, donde los médicos piden frecuentemente pruebas adicionales en una muestra que se presume que ya está en el laboratorio. En tales casos, el seguimiento ayuda al técnico a localizar una muestra aceptable, después de lo cual el o ella introduce la nueva prueba "añadida" en el SIL e imprime una nueva etiqueta de identificación de muestras. Si no se encuentra una muestra aceptable, la petición de la prueba debe introducirse en el SIL para permitir que un flebotomista o una enfermera haga la recogida. La complejidad del proceso para manejar pruebas añadidas produce frecuentes errores como resultado.



Conexiones con el instrumental analítico

Los instrumentos automáticos realizan la mayoría de las pruebas en los laboratorios clínicos. La conexión entre un instrumento y el SIL requiere compatibilidad de software y hardware, pero una vez conseguida aumenta notablemente la productividad y se reducen los errores. El SIL y el instrumento deben estar unidos por una conexión física compatible. La mayoría de los instrumentos del laboratorio clínico esperan que la conexión física de datos se ajuste al estándar RS-232C de la Electronic Industries Association.^{ref(301)} Para reducir las variaciones en esta especificación, la American Society for Testing and Materials (ASTM) emitió el estándar E1381 que especifica con más detalle los requerimientos físicos y las interacciones eléctricas.^{ref(302)} El programa de conexión debe estar disponible en el SIL para permitir recibir y transmitir datos desde y hacia un instrumento. Aunque la conexión física entre los instrumentos y el SIL precisa adaptaciones mínimas, existen considerables diferencias de programas entre instrumentos automatizados aún con estándares de software como el ASTM E1394.^{ref(303)} Como las normas actuales no son satisfactorias, la mayoría de los fabricantes de instrumentos facilitan al proveedor de SIL las especificaciones de conexión del instrumento antes de introducirlo en el mercado para dar tiempo a que se desarrolle el programa de conexión. Esto generalmente requiere programas separados (y gasto) para cada instrumento. Algunos instrumentos necesitan varios programas de conexión para gestionar diferentes versiones del mismo instrumento.

Un instrumento conectado debe ligar cada muestra con su petición de pruebas específica. Muchos instrumentos modernos vinculan la muestra mediante el número de laboratorio en código de barras situado en la etiqueta de identificación de la muestra. Normalmente el instrumento lee el código de barras de la etiqueta y lo transmite al SIL junto con los resultados analíticos. Una conexión es *unidireccional* si el instrumento solo transmite, o *carga*, resultados al ordenador del SIL; la conexión es *bidireccional* si el SIL puede transmitir, o *cargar*, información al instrumento mientras recibe información cargada desde el instrumento. La información más frecuente transmitida a un instrumento desde el SIL son las pruebas que han sido solicitadas para una muestra. En un instrumento conectado bidireccionalmente, el instrumento primero transmite el número de muestra al SIL, a continuación el SIL devuelve la información sobre las pruebas que han sido solicitadas, el instrumento realiza automáticamente las pruebas solicitadas, y finalmente envía los resultados al SIL. Las comunicaciones e interacciones entre el ordenador central del SIL y el instrumento pueden ser complejas. Además de esta complejidad está el requerimiento de algunos instrumentos de una respuesta inmediata desde el SIL después de leer el código de barras de la muestra. El software necesario para una conexión unidireccional es, por tanto, considerablemente más simple que para una conexión bidireccional.

Si el instrumento no tiene la capacidad de identificar la muestra automáticamente a través de la conexión, el operador debe vincular manualmente la muestra en el instrumento con el número de muestra en el ordenador. El orden en el que el SIL procesa las muestras para un instrumento específico se llama una *lista de trabajo* o *lista de carga*. Se utilizan por lo menos tres maneras de crear una lista de trabajo. Un método consiste en que el operador del instrumento cree manualmente ("construya") una lista de trabajo en el SIL entrando el número de muestra y la posición en el instrumento. Por ejemplo, la posición 1 en el instrumento contiene la muestra A, la posición 2 en el instrumento contiene la muestra B y así



sucesivamente. Alternativamente solo puede introducirse el número de muestra y el orden de posición en el instrumento se facilita de forma implícita sin una posición física en la bandeja o una copa. Este método requiere que los resultados sean descargados desde el instrumento en el orden en que se procesa las muestra. Utilizando un lector manual de código de barras, el técnico puede usar el SIL para construir rápidamente una lista de trabajo de forma más automatizada y menos proclive a error. El tercer enfoque consiste en que el ordenador construya automáticamente la lista de trabajo, siguiendo normalmente el orden de recepción de las muestras o el número de petición de la muestra, y que el operador cargue el instrumento en este orden. Esto evita al operador entrar la información necesaria para las listas de trabajo pero requiere que localice las muestras y las cargue en el orden especificado. Para laboratorios pequeños, la lista de trabajo generada por el ordenador es generalmente más eficiente, ya que el área de recepción puede poner a menudo las muestras en el orden especificado por el ordenador. En laboratorios más grandes, la existencia de múltiples áreas de recepción complica el orden de recepción de las muestras, siendo más fácil para el operador especificar de forma explícita la lista de trabajo utilizando uno de los dos enfoques anteriores mas que estar buscando una muestra específica.

Los problemas se originan cuando se utilizan dos o más instrumentos con código de barras para realizar la misma prueba y cada instrumento tiene un formato diferente de etiquetas de código de barras. El problema se complica además por el limitado espacio disponible en los tubos de extracción pequeños, que impiden la aplicación de múltiples códigos de barras. Si los diferentes requerimientos no permiten un formato común de etiqueta el usuario debe decidir un formato por defecto o, si el SIL lo permite, instaurar los criterios para seleccionar el formato más probable. Una mala colocación de la etiqueta en la muestra puede ser también causa de que el instrumento lea mal el código de barras. Si se necesita una etiqueta correcta de código de barras, el usuario debe reimprimirla antes de procesar la muestra en el instrumento. La ASTM ha publicado un estándar para la colocación del código de barras en las muestras. Dadas las limitaciones mecánicas en el diseño de algunos instrumentos existentes, la adaptación actual del estándar [ref\(304\)](#) de código de barras puede retrasarse hasta que se substituyan los diseños antiguos.

Validación de datos

En cualquier instrumento conectado, el operador revisa y aprueba, o *valida*, los resultados de las pruebas antes de ser enviados al informe del paciente. Generalmente la validación se realiza por lista de trabajo. El proceso de validación comienza con la impresión de un *informe de validación* por el SIL, seguido del técnico que excluye resultados y luego valida toda la lista de trabajo en un terminal. Un procedimiento alternativo, sin papel, consiste en validar las muestras, una a una, en un terminal de SIL. La validación por lotes puede ser más eficiente para el operador del instrumento pero retrasa los informes. En la mayoría de los sistemas, la revisión de las muestras durante la validación se produce siguiendo el orden en que fue creada la lista de trabajo, o por la ordenación numérica del número de muestra. Si los resultados están fuera de unos parámetros predeterminados, el operador del instrumento debe realizar unas funciones ya especificadas, como una dilución o una repetición del análisis. A menudo, el SIL muestra el análisis inicial y la repetición permitiendo al operador validar uno de los dos resultados o rechazarlos ambos.

Algunos instrumentos, particularmente los que se utilizan para análisis de gases en



sangre, procesan las muestras una a una. La petición de análisis se produce frecuentemente en el momento del análisis más que con antelación. En estos instrumentos, la interacción entre el analizador, el SIL, y el operador es mayor y requiere mas trabajo que otros instrumentos. La petición de pruebas, la entrada de resultados y el proceso de validación es similar al de los instrumentos mencionados anteriormente pero se realiza de forma seriada y manual para cada muestra. Algunos analizadores hematológicos antiguos también funcionan de esta forma.

Entrada de resultados

Automatizada.

La interacción entre un técnico y un instrumento automatizado ha sido discutida parcialmente con anterioridad. En un instrumento conectado bidireccionalmente el proceso de entrada de resultados se realiza de forma automática. La mayoría de los SIL ponen los resultados, en un área de espera, para que el técnico haga una revisión y validación manual de los resultados entrados (ver sección previa). Esta área de espera limita el acceso a los resultados al personal del laboratorio. Después de la validación los resultados son desbloqueados para poder informar a los usuarios externos. El SIL puede tener disponibles algunas características para ayudar al técnico durante el proceso de revisión. Esto normalmente incluye la aparición de alarmas que indican resultados fuera del rango de referencia, resultados que amenazan la vida del paciente (valores críticos o "de pánico"), resultados fuera del rango técnico, o aquellos que no cumplen la "*revisión delta*" (ver Capítulo 3). La mayoría de los SIL pueden mostrar también resultados previos de la prueba, permitiendo al operador realizar un control de identificación errónea de muestras. Cálculos, como el anión gap, pueden realizarse también durante el proceso de validación. Todas las especificaciones de estas características deben ser introducidas en el SIL por el personal del laboratorio.

Manual.

El laboratorio debe realizar la entrada manual de resultados de las muestras analizadas con métodos manuales o de las pruebas realizadas en instrumentos que no están conectados. Los instrumentos que procesan un bajo volumen, de muestras pueden estar sin conectar a causa del costo económico de la conexión o debido a la complejidad que supone construir listas de trabajo y validarlas. La entrada manual de resultados puede utilizarse también cuando fallan las conexiones o en condiciones especiales como puede ser la repetición de pruebas en un instrumento diferente. Para los análisis por lotes, el operador genera primero una lista de trabajo, similar a la descrita para un instrumento, e imprime una hoja de trabajo. La hoja de trabajo tiene normalmente una lista de los números de muestra con los datos del paciente y espacios en blanco para que el usuario escriba los resultados. Esta hoja de trabajo es una guía para el orden en que van a procesarse las muestras y facilita un lugar para la transcripción manual de resultados de forma que puedan ser introducidos posteriormente en un terminal.

Como el técnico entra los resultados manualmente en el terminal de ordenador, muchos sistemas comprueban los datos buscando fiabilidad técnica, resultados que amenazan la vida del paciente, revisión delta, límites anormales, resultados previos y otras condiciones que hallan sido especificadas para ese puesto, similar a las de los sistemas automatizados. Para ayudar en el proceso de entrada de datos, el software puede realizar cálculos automáticos, y las terminales pueden estar estructuradas de forma que el teclado realice



funciones especiales. Por ejemplo, hay programas que pueden convertir el teclado numérico de un terminal de entrada de datos en un contador diferencial. Para ayudar en el área de urianálisis el ordenador puede traducir la simple pulsación de la tecla *m* en la palabra *muchos*. Después de la entrada de resultados, se imprime un informe de validación similar al de los instrumentos automatizados. El informe es similar a la lista de trabajo inicial con los resultados de las pruebas reemplazando las líneas en blanco. Normalmente, el técnico que realiza la prueba también valida la lista de trabajo de manera similar a la de los instrumentos automatizados. En algunas áreas, puede necesitarse un segundo técnico para validar resultados críticos además de o en lugar del primer técnico. Aún con ayuda del ordenador, la entrada manual de datos puede ser tediosa y provocar errores, sobre todo si las listas de trabajo tienen mas de 100 o 150 pruebas. Para conseguir una mayor eficiencia, la entrada manual de datos se realiza al final de la jornada de trabajo o al final de una serie. Esto puede retrasar los informes de resultados si los resultados finalizados están pendientes de la entrada de estos datos.

Informes de resultados

El producto final de cualquier laboratorio clínico son sus resultados, generalmente en forma de un informe en papel. Los informes en papel continúan siendo exigidos como forma de entrada legal en la historia del paciente, y siguen siendo un método importante de comunicación de los resultados del laboratorio. La transmisión electrónica de resultados desde el SIL a las impresoras, terminales de ordenador, o localizadores manuales facilitan una alternativa más rápida para que el médico pueda disponer de los resultados en cualquier momento, sin intervención de un usuario. Los terminales remotos permiten a los usuarios obtener datos actuales e históricos en cualquier momento. Dependiendo de la ubicación y los conocimientos del usuario, puede instalarse cualquier combinación de estas opciones del SIL para reducir los retrasos asociados con la disponibilidad de los resultados de las pruebas a segundos, aun cuando el archivo físico de los informes continúe tardando horas o días. En muchas instituciones, los informes la consulta electrónica de resultados han reemplazado a los informes en papel, excepto aquellos que se necesitan para la historia del paciente. Los terminales y los localizadores remotos pueden reducir la utilización del teléfono para preguntar resultados, ahorrando tiempo de personal y reduciendo los errores asociados a la transcripción.

Las agencias de acreditación y la práctica médica continúan pidiendo informes en papel para la historia médica. Los informes en papel continúan siendo importantes para consultar resultados de análisis que no se necesitan inmediatamente. Para pacientes externos, el SIL imprime un informe por la noche con todos los resultados que se han completado. Además del informe necesario para la historia del paciente, se envía una copia por duplicado al médico solicitante u otro personal clínico. La mayoría de los informes de pacientes externos registran los resultados de una forma simple conteniendo (1) los datos demográficos del paciente, (2) hora en que se generó el informe, (3) nombre del laboratorio que ha realizado e informado el análisis, si todos los resultados no son del mismo laboratorio, (4) nombre o nombres de la prueba, (5) fecha y hora de recogida del o los análisis, (6) resultados con aviso de alarmas si es necesario, (7) intervalos de referencia, (8) resultados y comentarios de la petición, (9) médico o médicos solicitantes. Con el informe electrónico, la impresión de informes en una ubicación, tiene poco o ningún sentido, ya que es más lenta y más difícil de usar. Las Regulaciones



Federales (Clinical Laboratory Improvement Amendment of 1988, CLIA '88) y el sentido común indican que el SIL tiene la capacidad de reimprimir informes fácilmente cuando se necesitan. En muchas de las instituciones que usan este sistema, son frecuentes los atascos de impresoras y más frecuentemente la pérdida de resultados.

Para pacientes ingresados, los informes para la historia se imprimen generalmente en un formato *acumulativo* (Fig. 18-2), en el cual los resultados actuales y anteriores se imprimen de forma tabular. Con frecuencia, las pruebas aparecen como una columna en la página, con las fechas de los resultados de las pruebas visualizados en filas horizontales. Otra forma alternativa es que aparezcan las fechas en columnas y las pruebas en filas. Con este formato tabular, puede aparecer una elevada densidad de resultados en una página. Durante el ingreso puede incluirse en el informe acumulativo, cualquier resultado informado en los últimos 3-5 días. Normalmente, el informe acumulará los resultados de toda una estancia del paciente ingresado o de cualquier otro intervalo predeterminado. Los informes parciales se imprimen hasta el final de este intervalo (por ejemplo la salida del paciente), en cuyo momento se imprime un informe final permanente. El formato acumulativo se utiliza casi siempre para pacientes ingresados y raramente para pacientes externos. Para estos pacientes, los informes contienen normalmente una o más líneas para cada resultado (Fig. 18-3). La principal razón para no usar informes acumulativos en pacientes externos es la dificultad para archivar el informe y para determinar la próxima vez que la prueba será solicitada.

La tecnología de la impresión cambia continuamente, cambiando la apariencia de los informes del paciente. Con impresoras matriciales convencionales, la uniformidad de los tipos de letra del informe hace difícil su lectura e impide el uso de gráficos. Con impresoras láser, la variación del tamaño y los tipos de letra ayudan a enfatizar hallazgos significativos y producen informes más legibles pero con un costo mas elevado de consumibles de impresión. Muchos SILs permiten incluir *informes interpretativos* para ayudar a los clínicos. Estos informes contienen comentarios para explicar uno o más patrones de resultados. Estos informes, aunque bien recibidos por los médicos de asistencia primaria, probablemente son ignorados por los especialistas, por lo que el laboratorio debe usarlos selectivamente. Muchos sistemas todavía no permiten la inclusión de imágenes gráficas en sus informes.

Control de calidad (Ver también Capítulo 21)

El SIL puede contribuir también a mejorar la eficiencia de los técnicos y los administradores sirviendo de apoyo a los procedimientos de control de calidad (CC). Las actividades diarias de CC que mantienen la precisión y exactitud de los resultados tienden a ser bastante uniformes entre muchos laboratorios, particularmente con respecto a los requerimientos regulatorios que precisan un estricto cumplimiento de los protocolos especificados. Esta regulación (CLIA'88; DHHS 1990) requiere que los laboratorios mantengan la información del control de calidad asociada con cualquier resultado de análisis emitido, y muchos de los SILs capturan estos datos de manera automática o manual.

EL CLIA'88 define una *serie* como el intervalo en el cual la exactitud y precisión del sistema de análisis se espera que sea estable pero que no puede ser mayor de 24 horas (CLIA'88 1992). Muchos SILs permiten a los usuarios definir una serie que equivale a una bandeja física de muestras o a realizar análisis de forma continua entre controles. Estas series, sin embargo, puede que no cumplan los requerimientos del CLIA si no tienen muestras de control apropiadas. Algunos SILs tratan los controles como si fuesen muestras de pacientes y



realizan los análisis estadísticos mas adelante; otros tratan los controles de manera que faciliten al usuario una respuesta inmediata. La mayoría de los instrumentos tienen ordenadores incorporados, y es poco frecuente que un SIL soporte el cálculo de curvas estándar a partir de las muestras de calibración. Aunque el SIL puede restringir la emisión de resultados por series mediante la revisión de los resultados de los controles, de la condición del instrumento, y de los datos demográficos del paciente, la mayoría de los sistemas dejan tales decisiones al operador.

Numerosos cálculos y comprobaciones del control de calidad son realizados normalmente y fácilmente por un SIL, permitiendo al técnico revisar e interpretar los datos del CC de forma conveniente. Esto incluye la comprobación de rutina de controles que se desvían de una media esperada más de un número especificado de desviaciones estándares o valores que se desvían de unos límites esperados según reglas más complejas.^{ref(305)} En laboratorios más grandes las comparaciones de controles y calibradores entre instrumentos, métodos, y a nivel de prueba ayudan a garantizar la consistencia de los resultados. La mayoría de los sistemas SIL pueden facilitar normalmente esta información de control de calidad en formato resumido y cuando se realiza el análisis. La gráfica de Levy-Jennings es una herramienta popular para seguir y mostrar esta información. Normalmente el SIL estratifica las estadísticas de control de calidad por instrumento, por metodología, y por el analito; y permite comparación de controles en los tres de niveles. Llevar a cabo la revisión delta de los valores de un paciente con sus propios resultados previos puede ayudar también a determinar problemas de identificación de muestra.^{refs(306)}

Garantía de calidad (Ver también Capítulos 2, 3, y 21)

El SIL puede recoger y facilitar información útil para las actividades de garantía de calidad (AC). La capacidad del SIL para realizar un muestreo del 100% con poco esfuerzo fomenta un nivel de control de laboratorio, que no es posible con un sistema manual. Las actividades de AC son utilizadas por la dirección para descubrir y corregir problemas relacionados con la capacidad del laboratorio de proveer el nivel de servicio requerido. A continuación veremos varios ejemplos de como el SIL puede ayudar en las actividades de AC.

Primero, el tiempo de respuesta se ha convertido en un indicador importante del promedio de calidad total del servicio para áreas de gran exigencia del hospital. Combinado con el seguimiento de muestras, esta información ayuda al director del laboratorio a identificar cuellos de botella operativos observando aquellas muestras que sobrepasan parámetros predeterminados. Esto ayuda a distribuir adecuadamente el personal por áreas y a identificar períodos de picos de trabajo.

Segundo, el informe sobre la corrección de errores puede ayudar a identificar las fuentes de errores. Los errores pueden ocurrir durante el proceso preanalítico, durante el análisis o después del análisis. El error más frecuente en el proceso preanalítico es la identificación errónea del paciente o de la muestra. La entrada manual de datos, preanalítica y postanalíticamente, puede tener como mucho un 1% a 3% de errores, la mayoría de los cuales es poco probable que puedan ser detectados aún con herramientas sofisticadas como la revisión delta , o la validación realizada por un supervisor. Una forma de evaluar los errores es comparar los datos introducidos automáticamente en el ordenador con los datos que esperan ser entrados manualmente. Aunque esta comparación puede ser tediosa, se pueden identificar los problemas sistemáticos asociados con la entrada de datos de resultados o de

peticiones. El ordenador también puede facilitar información sobre los resultados de las pruebas que han sido corregidos. La mayoría d los sistemas suministran una vía para cambiar resultados después de haber sido validados. Dependiendo del laboratorio, la función de corregir resultados, puede estar limitada a unos pocos individuos. Posiblemente el aspecto más difícil del cambio de resultados yace en el efecto sobre los informes de los pacientes. Aunque los informes puedan reimprimirse, los informes anteriores permanecen en la historia y pueden confundirse potencialmente. La mayoría de las agencias federales y otras agencias reguladoras exigen que los resultados corregidos se indiquen como tal en los informes de los pacientes.

Tercero, el laboratorio puede controlar la calidad de la asistencia al paciente combinando los datos disponibles en otros sistemas de ordenadores del hospital, como el sistema de farmacia. Los efectos adversos asociados con la gentamicina, por ejemplo, pueden reducirse combinando registros de dispensación del fármaco con niveles del medicamento, pruebas de función renal, y patrones de sensibilidad antimicrobiana. Esta información puede ser usada entonces para avisar al médico sobre una dosis tóxica o ineficaz.

Cuarto, un simple informe de paciente con resultados excesivamente anormales suministra casos docentes interesantes de laboratorio así como la detección de posibles problemas. La mayoría de los SILs elaboran una importante cantidad de información de AC a través de los subsistemas de epidemiología y citología para cumplir las regulaciones del Joint Committee on Accreditation of Health Organizations y del CLIA. Aunque estas actividades puedan realizarse en otros ordenadores, el nivel de detalle que contienen la mayoría de los SILs en estas áreas permite un informe más preciso.

La mayoría de los sistemas de información son capaces de generar muchos más datos de los que pueden revisarse. Los informes personalizados requieren recursos humanos y tiempo de ordenador y deben justificarse por su utilidad para cumplir las metas del AC.

El cuadro siguiente indica algunos ejemplos de informes de gestión disponibles con un SIL.

Ejemplos de Informes del SIL*
Garantía de calidad Tiempo de respuesta Corrección de resultados después de ser validados Correlación de los resultados del laboratorio con la administración de fármacos Correlación de la sensibilidad antimicrobiana con la administración de antibióticos.
Informes de gestión Volumen de pruebas por área de laboratorio Estadísticas de carga de trabajo Utilización de perfiles Rentabilidad y costo/rentabilidad de los perfiles
* Ver más ejemplos en el capítulo 2.



Informes de gestión

Los informes de gestión y los informes de AC difieren solo en su finalidad. En teoría, los informes de gestión facilitan información que puede usarse para mejorar la eficiencia de las operaciones mediante la redistribución del personal y los recursos. Los informes de AC se utilizan para mejorar la calidad total del servicio.

Aunque algunos consideran al informe de gestión como un subproducto de la implantación de un sistema informático, otros lo ven como el principal beneficio del ordenador. Sin embargo, la información de gestión que suministran los sistemas de información puede que no demuestren su utilidad hasta que se hayan establecido tendencias después de varios años. Mucha de la información recogida para el CC y AC, mencionada anteriormente, puede ser utilizada también como informes de gestión. Uno de los informes utilizados con más frecuencia desde cualquier SIL es la lista de pruebas y la frecuencia con que se solicitan. Esta información puede utilizarse desde una perspectiva operativa para proyectar las necesidades de: instrumentación, personal, y otros recursos. Utilizando la estadística del ordenador, los métodos estándar para el control de la carga de trabajo facilitan información respecto a la plantilla apropiada de personal y pueden ayudar a modificar las tareas de los empleados a medida que cambian los patrones de petición de pruebas.^{ref(307)} La información de la carga de trabajo también ayuda a identificar individuos o áreas de trabajo ineficientes. Otro informe común es la lista de transacciones de facturación, que se genera normalmente durante la noche.

Todos los sistemas informáticos de laboratorio pueden facilitar datos sobre los perfiles de petición de pruebas que utilizan los médicos. Estos datos son a menudo difíciles de interpretar, ya que las peticiones no permiten identificar al médico solicitante, o si la prueba fue pedida por un estudiante de medicina que utiliza el nombre del médico responsable. La política de gestión de petición de pruebas es también difícil. Con la llegada del control del gasto en los sistemas de salud, sin embargo, estos datos están siendo utilizados con más frecuencia tanto para recomendar como para eliminar pruebas innecesarias.

Tecnología de los Sil

El *hardware* hace referencia a la parte física de un ordenador, que en su mayor parte no sufre cambios después de su fabricación. La mayoría del hardware es producido masivamente en fábricas. El software hace referencia colectivamente a una serie de instrucciones, denominadas programas, que dirigen las acciones de un ordenador. En contraste con el hardware, el software se actualiza frecuentemente después de su entrega. La programación, el proceso intelectual de crear programas, requiere grandes cantidades de tiempo y esfuerzo. Como consecuencia, los costos de software han subido dramáticamente aunque los costos de hardware han bajado. En 1970, el software representaba aproximadamente el 10% del costo total de un sistema informático, y en 1980 este porcentaje aumentó a más del 60%. Hoy un SIL incluye software de aplicaciones, gestores de base de datos, intérpretes, y sistemas operativos, y este software constituye más del 75% del costo total de un sistema. El rápido descenso de los costos de hardware, aument la demanda de

698



información, y la conexión entre sistemas incrementará más la relación de costo software-hardware. Dado que el software representa una importante inversión en la compra de un sistema, y los proveedores de hardware cambian rápidamente sus productos y puede que no sean capaces de dar soporte a sus productos por mucho tiempo, la mayoría de las compañías de software tratan de diseñar sus productos para que sean de alguna forma independientes del hardware.

Hardware

El hardware de los ordenadores continúa cambiando de forma dramática aún después de más de 30 años de evolución continua. Tradicionalmente, los proveedores de SIL han utilizado *miniordenadores*, una clase de ordenador caracterizado por costos en el rango de los US\$50,000 a US\$500,000 y que presta apoyo a nivel departamental. Los proveedores de SIL, particularmente aquellos que prestan servicio a los laboratorios pequeños, también tienen productos que utilizan ordenadores personales que cuestan menos de US\$1500 cada uno, para reducir los costos de hardware. Mas raramente, los proveedores distribuyen software de SIL para *ordenadores centrales*, una clase de computadores que frecuentemente cuestan más de US\$500,000. La economía dicta que un SIL que opera sobre un ordenador central solo puede tener un costo eficiente si se comparte con otro software, como un sistema financiero. El software de aplicación del SIL que se ejecuta sobre una clase de ordenadores requiere normalmente una importante reprogramación si va a ser utilizado en otras clases de ordenadores.

En el corazón de cualquier diseño de hardware de ordenador yace la *unidad central de proceso*, o *CPU*. Una CPU es responsable de tomar decisiones lógicas, realizar cálculos y traducir instrucciones de programa en acciones. Normalmente, la CPU consiste en uno (o más) microprocesadores de silicio junto con algunos circuitos asociados. Los términos *RISC*, o *conjunto reducido de instrucciones de computador*, o *CISC*, o *conjunto complejo de instrucciones de computador*, se han usado para describir las diversas clasificaciones de diseño de CPU. Comparado con un diseño CISC, el diseño RISC es más simple pero requiere más instrucciones para ser ejecutadas en una determinada tarea. Un ordenador RISC normalmente corre más rápido que un CISC pero necesita más recursos de disco y memoria. Como los precios de los discos y la memoria están bajando, los diseños RISC se están utilizando con mas frecuencia. Una CPU también requiere una *RAM*, o *memoria de acceso aleatorio*, que es utilizada por la CPU para almacenar datos temporalmente y volver a acceder a ellos con rapidez. Es análoga a la memoria humana a corto plazo.

Los datos que requieren almacenamiento a largo plazo se transfieren a *discos* y *cintas*. Los discos son dispositivos que almacenan datos en forma magnética u óptica sobre un medio que gira. Los medios ópticos tienen la ventaja de poseer una densidad más alta, o sea, son capaces de almacenar más datos en una área determinada, pero la recuperación y el almacenamiento en medios magnéticos son más rápidos. Los medios ópticos se utilizan frecuentemente para almacenar datos históricos, donde la velocidad de acceso no es importante. Los discos ópticos en formato CD-ROM pueden usarse para distribuir información producida de forma masiva. La información antigua puede transferirse también a una cinta magnética, pero el formato lineal de la cinta hace que la recuperación de datos sea más lenta que desde el disco óptico. Como la escritura en cinta magnética es rápida, este medio se utiliza frecuentemente para hacer copias de respaldo ("back-up") de los discos. La



copia de respaldo de los discos se realiza periódicamente para impedir la pérdida de datos producidas por averías, también llamadas *caídas de disco*. Los medios en cinta constituyen también una forma conveniente de transferir información entre ordenadores separados electrónicamente.

Sistemas operativos

El *sistema operativo* es el software que supervisa la ejecución ordenada de programas y suministra apoyo de funciones básicas utilizadas normalmente por todos los programas. Algunas de estas funciones incluyen la gestión de discos y archivos, el soporte operativo de los terminales de ordenador (tubos de rayos catódicos) y las impresoras, y el soporte para la red de ordenadores (ver la sección siguiente). *MS-DOS* es un ejemplo de un sistema operativo para el PC de IBM. *Unix* es un ejemplo de un sistema operativo para Los sistemas operativos pueden designarse como monousuario/monotarea en el que un único usuario puede ejecutar un solo programa a la vez, monousuario/multitarea en el que un único usuario puede ejecutar más de un programa a la vez, o multiusuario donde varios usuarios pueden ejecutar muchos programas a la vez. La mayoría de los SIL operan bajo sistemas operativos multiusuario. Para aplicaciones como las de laboratorio, también se necesita una capacidad de *tiempo real*. El tiempo real se refiere a la necesidad de capturar y procesar inmediatamente los datos introducidos dentro de unos límites de tiempo especificados. Por ejemplo, algunos analizadores de alto volumen pueden tolerar solo un retraso de 5 segundos entre la introducción del número de muestra y la obtención de las pruebas solicitadas que se han de hacer en esa muestra.

Lenguajes de programación

Los primeros ordenadores estaban programados en un lenguaje nativo primitivo, el *lenguaje máquina* que consiste en números entrados mediante interruptores o tarjetas perforadas. A causa de la dificultad en asociar números binarios con instrucciones, se desarrolló un lenguaje simbólico el *lenguaje ensamblador* que realizaba algunas de estas tareas. Los SIL diseñados hasta finales de los años 1970 se programaban con frecuencia en lenguaje ensamblador porque utilizaba eficientemente el hardware, entonces caro. Este enfoque, sin embargo, era todavía demasiado lento para desarrollar software.^{[ref\(308\)](#)} Debido a estas limitaciones, los científicos que diseñan ordenadores, desarrollaron *lenguajes de alto nivel* para mejorar más la productividad. Desde un enfoque, un *compilador* traduce lenguajes de alto nivel, o *código fuente*, en el lenguaje máquina, o *código objeto*. Una vez producido, los datos en el código objeto pueden almacenarse y utilizarse sin el compilador o el código fuente. Frecuentemente, los proveedores mantienen el SIL propietario haciendo que el código fuente no esté disponible para el usuario. Si el código fuente se pierde, como después de una bancarrota, el usuario puede ser incapaz de hacer cambios en la programación. Ejemplos de lenguajes de alto nivel compilados incluyen el C, COBOL, Fortran, y Pascal. En un segundo enfoque, los lenguajes de alto nivel son procesados por un *intérprete*. Los intérpretes no producen código objeto pero examinan cada instrucción del código fuente y ejecutan los comandos como los entienden. Un lenguaje interpretado popular en el laboratorio es el MUMPS (Sistemas de actualización y multiprogramación del H General de Massachussetts o Massachusetts General Updating and Multi-Programming Systems), o M. Las ventajas y desventajas entre compiladores e intérpretes dependen de la aplicación específica y de las



preferencias.

Gestores de bases de datos

La mayoría de los SIL desarrollados desde 1984 utilizan sistemas especializados de software conocidos como *sistemas de gestión de base de datos*, o *DBMS*, para el almacenamiento físico y la recuperación de datos, liberando al proveedor de la interacción directa con el hardware y el software del sistema operativo. Un DBMS puede contemplarse como un lenguaje de programación de muy alto nivel. Su utilización ha acelerado mucho la programación de nuevos sistemas y ha añadido versatilidad a la expansión y alteración de las bases de datos. Algunos sistemas de bases de datos pueden diseñarse de forma que los usuarios finales sin experiencia en programación puedan realizar preguntas a la base de datos.

Los ordenadores son sinónimos de gestión y proceso de datos. Los programas operan generalmente sobre *datos* que pueden estar incluidos en el programa o sobre datos adquiridos de fuentes externas al programa, como los datos de pacientes. En ambos casos, los datos y su organización se denominan la *estructura de datos*. Los datos almacenados sobre discos, cintas, y otros dispositivos externos a la memoria principal, o la CPU, se organizan y agrupan en *archivos*. Aunque los archivos y las estructuras de datos puedan contener alguna información explícita sobre la finalidad y el tipo de información que está almacenada, la información adicional necesaria para una interpretación significativa de los datos puede estar implícita. Por ejemplo, un sistema de contabilidad omitirá casi siempre el signo de dólar (\$) y con frecuencia, el punto decimal. En otras palabras, \$15.25 aparecerá como 1525 en el archivo del disco. Esta información implícita hace que la utilización de datos de archivos sea casi imposible sin un conocimiento previo de otra información. Como el número de posibilidades para una estructura de datos es ilimitado, la información implícita mantiene una importancia significativa.

El propósito de cualquier diseño de base de datos es almacenar datos de manera que permita su recuperación con suficiente rapidez. Aunque sea posible almacenar datos sin organizar e intentar su recuperación de forma secuencial, los ordenadores llegarían a sus límites prácticos a pesar de su velocidad. Para hacer que la recuperación sea práctica, los datos se almacenan normalmente de manera que reflejen la forma en que serán utilizados. Se han desarrollado cuatro modelos para describir la organización habitual de las bases de datos. Estos incluyen los modelos de bases de datos *jerárquicas*, *en red*, y *relacionales*. Aunque la mayoría de las bases de datos no utilizan un modelo único puramente, los diferentes modelos dan a conocer algunas de las complicaciones y de las ventajas y desventajas asociadas con la implantación de sistemas reales.

El modelo jerárquico, es el modelo más simple y el que se utiliza con más frecuencia en los sistemas de laboratorio. En este modelo, todos los datos se tratan como una estructura de árbol invertido con todos los datos descendiendo desde una raíz. En un SIL, el elemento raíz es normalmente un identificador único del paciente como el nombre o un número de paciente (Fig. 18-4). Para la recuperación rutinaria de datos de atención al paciente, este modelo de datos trabaja muy bien en general y puede utilizar eficientemente los recursos del computador. Sin embargo, este modelo fracasa si tratamos de recuperar resultados anormales de laboratorio, ya que fuerza al ordenador a buscar todos los resultados en todos los pacientes. Si tales casos son frecuentes, debe construirse otro árbol para almacenar los datos de nuevo para obtener un rendimiento satisfactorio. Las copias múltiples de datos introducen otros



problemas, particularmente si los datos se cambian. A pesar del rendimiento del hardware moderno, la eficiencia s todavía importante cuando se trabaja con conjuntos muy grandes de datos, como 2 a 3 años de datos históricos en una institución grande. El lenguaje de programación M es un ejemplo de sistema que soporta directamente un gestor de base de datos jerárquico.

Las bases de datos en red permiten a los usuarios recobrar datos de múltiples formas y resolver los problemas asociados con el mantenimiento de múltiples copias de los mismos datos, estableciendo punteros de acceso múltiples hacia un único dato (Fig. 18-5). Este modelo de datos utiliza los recursos del ordenador de forma muy eficiente y puede ser muy eficaz en muchas situaciones. Desgraciadamente, las relaciones entre datos diferentes pueden llegar a ser muy complejas y difíciles de comprender. Esta complejidad puede llegar a ser particularmente problemática si las relaciones de los datos cambian; esto quiere decir que, los sistemas construidos utilizando gestores de bases de datos en red se crean fácilmente pero son difíciles mantener. La mayoría de los gestores de bases de datos más comunes están basados en el modelo distribuido.

El *sistema de gestión de bases de datos relacional* ha llegado a ser popular a causa de su facilidad de uso. Los datos aparecen como tablas, y las operaciones de la base de datos se convierten en operaciones sobre tablas que pueden ser realizadas con facilidad por los usuarios (Fig. 18-6). Esta flexibilidad ha ganado para las bases de datos relacionales, un fuerte papel en situaciones donde los datos se manipulan frecuentemente, como en un entorno de investigación. Un efecto secundario de esta flexibilidad es que las bases de datos relacionales utilizan los recursos del ordenador menos eficientemente que los modelos más simples, y esto puede presentar problemas con grupos de datos muy grandes. Algunos ejemplos de bases de datos relacionales son IBM DB2, Oracle, y Sybase. Muchas otras bases de datos sostienen frecuentemente que son relacionales pero están basadas en el modelo distribuido. Pocos SIL utilizan bases de datos relacionales para transacciones de gran volumen de datos a causa del rendimiento y los costes, aunque algunos sistemas transfieren datos desde un gestor de bases de datos de producción no relacional a un gestor de bases de datos relacional para consultas "ad hoc". Estos enfoques híbridos pueden emigrar completamente hacia un gestor de bases de datos relacional según se vayan abaratando los recursos de hardware.

Las estructuras de datos son críticas en el diseño de los programas. Primero, los datos de los pacientes almacenados en un SIL consumen la mayoría del disco y de la memoria de almacenamiento. En un SIL, la cantidad de datos de laboratorio sobrepasan fácilmente a los programas necesarios para ejecutar el sistema en varios órdenes de magnitud. El diseño de la estructura de datos puede imponer limitaciones sobre la información almacenada. Un sistema podría estar limitado a almacenar datos de 2000 pacientes, mientras un segundo sistema podría estar limitado a 64,000 pacientes. El proveedor del sistema mas pequeño puede haber introducido esta restricción para que su SIL trabaje más rápido y más eficientemente y necesite menos almacenamiento de disco, produciendo así un sistema mas barato que el más grande. Pero esta eficiencia es irrelevante si las necesidades del usuario sobrepasan los 2000 archivos de pacientes activos.

Redes de ordenadores

Una *red de ordenadores*, o *red*, es un concepto diferente del modelo de base de datos en red. Una red es una interconexión entre sistemas de ordenadores o entre un terminal de



ordenador y un ordenador que soporta el intercambio de datos. Si la red está localizada físicamente dentro de un área limitada, como de 1 a 2 millas, se denomina *red local de ordenadores*, o LAN. Si la red se expande a un área más grande, se llama una *red de área amplia*, o WAN. La tecnología LAN de alta velocidad es barata y con frecuencia la instala el usuario. La mayoría de los ordenadores de empresas incluyen *Ethernet* como parte integral del hardware, y estos sistemas precisan redes para comunicarse con otros ordenadores, como la red para realizar funciones de ABT y facturación. El intercambio de datos entre distintos ordenadores requiere que el software soporte un protocolo común, o una forma acordada de intercambio de datos. Desafortunadamente, las incompatibilidades entre proveedores de software, proveedores de hardware, y el software de las aplicaciones, hacen que este intercambio sea altamente complejo.

Como las redes avanzan en velocidad y capacidad, han surgido sistemas de ordenadores que permiten la implantación de una arquitectura *cliente/servidor*. Este término describe una interacción específica entre dos ordenadores conectados en red. El ordenador del servidor tiene la base de datos desde donde el cliente recupera y procesa datos para su uso. Si el cliente actualiza los datos, generalmente actualizará los datos en el servidor. El enfoque cliente/servidor ha llegado a ser muy popular en sistemas de SIL en dos áreas. En sistemas pequeños, algunos proveedores han implantado SILs con ordenadores personales baratos y software cliente/servidor, reemplazando sistemas basados en miniordenadores que son más caros. En sistemas más grandes han implantado una arquitectura de servidor para permitir a los usuarios con ordenadores personales descargar datos de forma que puedan procesarse independientemente.

La transmisión por microondas, satélite, teléfono celular, y otros sistemas de radiofrecuencia prestan su apoyo a las funciones de recogida móvil de información. Por ejemplo, algunos proveedores facilitan unidades pequeñas portátiles para flebotomistas, con el fin de aumentar la exactitud de la hora de recogida y para mejorar el proceso de identificación del paciente. Dispositivos de localización avanzados conectados a un SIL permiten a los médicos tener acceso inmediato a los datos de los pacientes tan pronto como estén verificados. Estos sistemas también pueden utilizarse para conectar sistemas de ordenadores donde no pueden usarse cables o son un inconveniente. La mayoría de estas tecnologías móviles son bastante más caras que los sistemas basados en cables. El efecto de todas estas tecnologías de red ha permitido la integración de información desde ubicaciones físicamente diversas. En muchas instituciones, estas redes son críticas para el soporte de laboratorios satélite, permitiendo a los satélites tener acceso a los datos de los pacientes, y en muchos casos la creación de estructuras que soportan operaciones de descentralización física y organizativa. [ref\(309\)](#) Estas operaciones satélite están siendo cada vez más importantes ya que los laboratorios crecen para cubrir alianzas sanitarias en expansión.

Otros Aspectos del Sil

Mantenimiento

Después de la instalación de un sistema informático, el usuario debe realizar numerosas actividades rutinarias, a menudo llamadas de mantenimiento. El *mantenimiento del sistema* se refiere a las actividades de mantenimiento que deben realizarse para permitir que el SIL opere

de forma óptima y para permitir la recuperación de datos en casos de fallos. La *copia de respaldo* (back-up), el proceso de realizar una copia de los archivos, es una de las actividades de mantenimiento mencionada previamente. La mayoría de los ordenadores precisan realizar también funciones de *mantenimiento de archivos* durante las cuales el ordenador reorganiza físicamente sus datos en el disco, de forma que optimiza su rendimiento. La mayoría de los sistemas operativos y los gestores de bases de datos permiten que las funciones de copia de respaldo y mantenimiento de archivos se realicen mientras el sistema está todavía disponible para cualquier potencial usuario del SIL. Como el espacio de los discos del ordenador es frecuentemente limitado, los archivos de los pacientes inactivos deben *archivarse*, transferirse periódicamente a medios de almacenamiento como cintas o discos ópticos, y *borrarse* del disco activo. Estos datos archivados requieren un acuerdo o autorización especial para su acceso. Los datos archivados en medios magnéticos no son permanentes y no reúnen la definición legal de archivo de datos, ya que pueden desaparecer a los 5 o 10 años. Es probable que los medios basados en discos ópticos satisfagan las definiciones legales futuras de archivo de datos.

El *mantenimiento del software* se refiere a las actualizaciones periódicas de los programas después de su instalación. Estas actualizaciones incluyen el software de aplicaciones y el de sistema, y se hacen normalmente con la finalidad de arreglar defectos del software o problemas de diseño, añadir mejoras o nuevas funcionalidades y suministrar soporte para un nuevo hardware o un sistema operativo que ha sido actualizado por otros proveedores. Las actualizaciones periódicas pueden tener lugar con tanta frecuencia como varias veces al año. En muchos sistemas modernos, el proceso de actualización del software puede producir más tiempo improductivo de ordenador que los fallos imprevistos.

Los gastos de mantenimiento del software siguen siendo una fuente importante de ingresos para la mayoría de los proveedores de software, que llega con frecuencia a un 1% a 1.5% anual del precio de compra. Sin embargo, estos gastos de mantenimiento son un gasto importante para los usuarios. Los usuarios inexpertos tratan con frecuencia el soporte de software como un contrato de servicio. Los usuarios con experiencia pueden cancelar el soporte de software para reducir gastos, especialmente cuando perciben que están recibiendo poco beneficio. Los proveedores a menudo intentarán convencer a los usuarios para que continúen con el soporte de software ofreciendo mejoras. Además de las actualizaciones suministradas por el proveedor, también deben incluirse en el mantenimiento de software los cambios debidos a contingencias intrainstitucionales. En el laboratorio, esto podría incluir cambios en la instrumentación automatizada. Cambios externos al laboratorio pueden ser el resultado de la substitución de sistemas interdependientes, como el sistema informático financiero. Cambios ordenados localmente durante un período de actividad elevada pueden añadir fácilmente un 25% al costo de mantenimiento y necesitar también inversiones adicionales. Con frecuencia, debido a sus propias necesidades administrativas, algunos proveedores solicitan que los usuarios realicen actualizaciones sean o no útiles para el mismo. Esto sirve con frecuencia para producir problemas en sistemas que por otra parte son estables.

Las funciones de mantenimiento pueden dar como resultado un *tiempo de parada* del sistema informático o sea periodos de tiempo en los que el sistema no está disponible para los usuarios. El tiempo de parada puede ser *programado* o *no programado*. El mantenimiento programado diario debe ser mínimo, generalmente menos de 15 minutos. Sin embargo, puede necesitarse hardware y software adicionales para conseguir esta reducción de tiempo. Las



actualizaciones de hardware y software son más difíciles de realizar sin tiempos de parada más largos y pueden ser necesarias de 2 a 4 veces al año. Los tiempos de parada no programados son generalmente el resultado de fallos del hardware o problemas del software. En la mayoría de los SILs debería ser posible un tiempo de parada total por debajo de un 1% o 87.6 horas al año. Los sistemas con alta disponibilidad pueden conseguir fácilmente tiempos de parada por debajo de un 0.1% o 8.76 horas al año. Esto constituye un avance significativo considerando que un tiempo de parada puede tardar 4 horas o más. Cada laboratorio debería determinar un nivel aceptable de tiempo de parada para el SIL.

Seguridad y privacidad de los datos

El equilibrio entre la necesidad de confidencialidad de los datos del paciente, la seguridad de los datos y el acceso a la información médica constituye un desafío a los sistemas informáticos, especialmente en un momento en el que crece la utilización de las bases de datos. El SIL crea una base de datos a la que se puede acceder directamente, a través del hospital o indirectamente a través de un ordenador secundario, como el sistema de información del hospital. Según mejora la tecnología de la historia médica electrónica, aumenta la disponibilidad de seguros médicos (Organizaciones para el Mantenimiento de la Salud), y progresa el sistema nacional de salud, estas preocupaciones entran más en conflicto al crearse una demanda mayor de información. Los ordenadores pueden facilitar un acceso fácil a la información y un control de las solicitudes, pero solo pueden conseguirlo con riesgo de disminuir la privacidad.

Los primeros SIL que usaban miniordenadores fueron diseñados solo para uso dentro del laboratorio y solo proporcionaban funciones mínimas de seguridad de datos. Los códigos de acceso identificaban a los técnicos y las funciones a las que tenían acceso. Debido a que el acceso externo de bajo costo beneficiaba tanto a los laboratorios como a los clínicos, se añadieron terminales del SIL a las estaciones de enfermería. Aún entonces, la seguridad no era importante, porque la mayoría de los datos a los que se tenía acceso no eran muy delicados y el número de usuarios era limitado. Sin embargo, los sistemas más nuevos almacenan los datos durante períodos de tiempo más largos, aumentando la probabilidad de que se exponga cualquier información delicada. Muchos de estos sistemas no han sido diseñados para prevenir intentos sistemáticos y determinados a ganar acceso a la información delicada.

Para controlar el acceso al SIL, la mayoría de los sistemas actuales requieren el uso de un nombre de usuario, seguido de una contraseña (password). El diseño de sistemas de seguridad debería permitir a los usuarios seleccionar solo contraseñas que tengan suficiente longitud y complejidad para prevenir un acceso por deducción. Incluso contraseñas largas basadas en palabras ordinarias del diccionario pueden ser descifradas por ordenadores programados para acceder de forma ilegal a un SIL. Los sistemas de seguridad o los procedimientos del laboratorio deberían forzar el cambio de contraseña con intervalos regulares. Muchos sistemas de seguridad de SILs limitan el acceso a funciones del sistema y a resultados de las pruebas mediante el uso de códigos. Por ejemplo, los médicos solo deberían tener acceso a los resultados de los análisis solicitados, los técnicos del laboratorio deberían tener acceso a las funciones de solicitud, resultados; y consultas y los administrativos que entran peticiones solo deberían tener acceso a las funciones de solicitud de análisis. Debería ser necesario un permiso especial de acceso para datos confidenciales delicados como los datos de los resultados del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV). Los sistemas de seguridad



del SIL deberían desconectar automáticamente los terminales inactivos para impedir accesos indebidos.^{ref(310)} En una institución grande la gestión de los permisos de acceso puede ser un problema extraordinariamente difícil, ya que los residentes, internos y estudiantes cambian frecuentemente de servicio y la información respecto a cual es su papel puede ser difícil de obtener. La información personal incluida en datos, como, el domicilio, la ubicación del paciente, las citas y las transacciones de facturas, también afectan a la privacidad pero son difíciles de bloquear debido al gran número de personas que necesita acceder a estos datos.

Las nuevas tecnologías han introducido varios desafíos adicionales. Primero, las redes de datos se están convirtiendo en omnipresentes con muchos ordenadores mas nuevos, que precisan conectarse a la red. Muchas redes institucionales están conectadas a Internet, una red con acceso internacional. Las redes permiten el acceso de gente poco escrupulosa a información confidencial de forma electrónica desde sitios físicamente remotos en otras partes del mundo. En casos infrecuentes, intrusos maliciosos pueden destruir o alterar los datos. La complejidad técnica ha impedido responder a los proveedores y usuarios. Por ejemplo, la encriptación de datos en las redes raramente se utiliza, facilitando que se puedan interceptar los datos.^{ref(311)}

Segundo, los costos del sistema nacional de salud y la sanidad han dado como resultado un aumento de la utilización de las bases de datos. Por ejemplo, Medicare está recogiendo datos buscando perfiles apropiados de atención al paciente y de utilización de recursos. Los seguros privados también recogen y guardan información del paciente de forma rutinaria. El intercambio y diseminación de esta información, tanto para beneficio del paciente como del proveedor, comprometerá aún más la seguridad y la privacidad. Finalmente, la utilización ordinaria de redes y microordenadores en los productos para SILs ha expuesto muchos sistemas a *virus informáticos* destructivos, programas informáticos que se introducen en el programa del sistema operativo. Muchos virus permanecen latentes durante largos periodos de tiempo y no son destructivos. Otros, sin embargo, realizan acciones destructivas cuando son activados por un suceso predefinido.

Los proveedores de SILs pueden y deben mejorar los sistemas de seguridad, pero es difícil debido a (1) leyes conflictivas, (2) diversificación de la práctica médica, y (3) el hecho de que añadir seguridad reduce la comodidad de los sistemas. Gostin y asociados revisaron las implicaciones legales sobre privacidad y seguridad en un sistema público nacional de salud.^{ref(312)} Diversos grupos de voluntarios han explorado también los problemas de privacidad asociados con la informatización, pero con pocos progresos. Incluso con las tecnologías existentes, los usuarios deben ser educados y animados a tomar medidas para mantener la privacidad. Por ejemplo, las redes y los ordenadores deben diseñarse considerando la seguridad de los datos más como una previsión que una corrección. Los ordenadores implicados en la atención de pacientes deben estar aislados del acceso de redes externas, físicamente o mediante la utilización de barreras electrónicas.

Disposiciones legales

El Clinical Laboratory Improvement Amendment de 1988 produjo cambios importantes en los laboratorios clínicos.^{ref(313)} Los sistemas de información son la herramienta más apropiada para la gestión, conservación de la información y previsión de carga de trabajo que requiere esta ley. Además de la adquisición de datos de control de calidad, carga de trabajo del técnico, y archivos de demostración de experiencia técnica, se incluyen previsiones

específicas para una correcta operación de los sistemas de información. Los proveedores de SILs prefieren implantar el software después de aclarados los detalles legales, lo que conduce frecuentemente a un retraso importante en el cumplimiento de las normativas. El principal efecto del CLIA '88 sobre el SIL estriba en las exigencias en el mantenimiento de los datos. Los archivos de peticiones de pruebas y los resultados obtenidos deben conservarse de una manera que pueda recuperarse convenientemente durante 10 años para los resultados de anatomía patológica y citología, durante años para los resultados de banco de sangre y tipaje de tejidos y durante 2 años para los demás resultados. Aunque pueda ser posible conservar los datos "on-line" en el sistema informático durante este período de tiempo, muchos laboratorios archivan sus datos en microfichas o en discos ópticos para una mayor durabilidad.

La descripción pormenorizada del Health and Human Services del CLIA '88 facilita directivas generales para una correcta operación del SIL.^{ref(314)} Antes de esto, la FDA publicó una regulación específica en 1988 clasificando el software de los sistemas de información de bancos de sangre dentro de los dispositivos médicos,^{ref(315)} haciendo así que los requerimientos para los ensayos y documentación de este software fuesen similares a los de dispositivos tales como los monitores de pacientes.^{ref(316)} Esta reglamentación está basada en la hipótesis de que el resultado de los errores de software darían como resultado errores en la dispensación de productos sanguíneos sin revisión médica.^{ref(317)} Los SILs que prestan servicio a otras áreas del laboratorio no están actualmente sujetos a directivas similares de ensayo y validación, pero algunos proveedores las han adoptado anticipando cambios regulatorios adicionales. Aunque estos procedimientos pueden reducir errores, también es cierto que incrementará el costo y retrasarán los cambios en los sistemas de información disponibles para el consumidor. La mayoría de las agencias voluntarias de acreditación, como el College of American Pathologists, están exigiendo documentación del desarrollo del software y de las operaciones del sistema informático de manera similar pero menos rigurosa que el CLIA '88.^{ref(318)}

Papel del SIL en hospitales computerizados

Como se ha mencionado anteriormente, el SIL frecuentemente interactúa con otros ordenadores recibiendo o transmitiendo información crítica. En un ambiente hospitalario, un ordenador administrativo conserva normalmente la información del paciente a través de interacciones con otros sistemas. Estas interacciones incluyen la verificación de los números de identificación del paciente, y de la información de la contabilidad del paciente y la actualización de la ubicación del paciente a través de un sistema ABT, la recepción de las pruebas solicitadas a través de un sistema de entrada de peticiones, y el envío de los resultados de los análisis al sistema de información del hospital. Después de guardar los resultados de las pruebas, el SIL puede enviar una cuenta al sistema financiero, con las transacciones del laboratorio, para informarle de los servicios que han sido realizados por el laboratorio. El sistema financiero realiza entonces la facturación y contabilidad necesarias, traduciendo generalmente las transacciones del SIL en cargos económicos, códigos CPT, y otras informaciones exigidas por la mayoría de las compañías de seguro. Si el SIL realiza su propia facturación y contabilidad, debe enviar una información similar a una compañía de seguro a través del EDI (intercambio electrónico de datos) o rellenando un impreso HCFA 1500. Desafortunadamente estos intercambios complejos entre ordenadores siguen siendo un problema y requieren un mantenimiento constante, ya que las regulaciones cambian constantemente. La actualización de las definiciones de pruebas en el laboratorio requiere una



coordinación con el sistema informático financiero. La ubicación del paciente, la definición de las pruebas, y otras informaciones deben estar coordinadas con el SIH y con otros sistemas clínicos.

En la mayoría de las instituciones, el SIL participa como un miembro en una cobertura compleja de sistemas de información computerizados sin relación, interconectados (Fig. 18-7). Las presiones para integrar la información del hospital aumentarán a medida que aumente la presión económica para reducir costos.

La importancia de compartir información se ha mencionado anteriormente en la sección de garantía de la calidad. El simple intercambio de información entre la farmacia y el laboratorio ayuda a detectar reacciones adversas a fármacos, dosificaciones inadecuadas, extracciones en tiempos inadecuados y toxicidad de los fármacos, todo lo cual influye negativamente en el costo de la atención al paciente. Un anatomopatólogo se beneficia cuando puede revisar una muestra de una biopsia hepática junto con los resultados de las pruebas de función hepática. El banco de sangre se beneficia cuando tiene acceso a la programación de los quirófanos. La integración de los datos antiguos y los datos de enfermería permite al hospital determinar el costo de la atención médica de un paciente clasificado en un DRG específico (Grupos Relacionados de Diagnóstico). El SIL es un componente esencial en una gran matriz de sistemas de información diseñados para soportar la distribución de la atención al paciente y no puede considerarse que actúe como un sistema aislado autosuficiente. Se ha prestado recientemente una considerable atención a la coordinación de información entre estos diversos sistemas y se ha identificado como un problema en una encuesta sobre las instalaciones de SILs.[ref\(319\)](#)

Desarrollo de estándares e intercambio de datos

Para controlar el elevado costo de desarrollo del software y la falta de coordinación entre los distintos sistemas de información, la industria informática sanitaria, SIL y usuarios del SIH, y el gobierno federal han creado grupos de voluntarios para establecer estándares, en especial para la interconexión entre sistemas de información y entre un sistema de información y un equipo computerizado. En el laboratorio clínico, los estándares se dirigen hacia el intercambio de datos (1) con sistemas de monitoreo a la cabecera del enfermo, (2) con sistemas administrativos, incluyendo aquellos asociados con clientes y agencias gubernamentales, y (3) entre sistemas de laboratorio. Tienen especial importancia aquellas funciones que cubren el intercambio de las peticiones de pruebas de laboratorio y los resultados. Tres grupos de voluntarios que han creado estándares en el área del laboratorio incluyen la ASTM, mencionada anteriormente con respecto a la instrumentación automatizada, el Institute of Electrical and Electronics Engineers (IEEE) y el comité HL7.

El comité HL7 se formó específicamente para desarrollar estándares que soporten el intercambio de información entre ordenadores en el ambiente hospitalario. Las áreas que cubre el comité HL7 incluyen ABT, facturación, datos demográficos del paciente, peticiones y resultados.

El protocolo ASTM E 1238 se ha convertido en la base para el intercambio de datos de laboratorio entre distintos sistemas.[refs\(320\)](#) Muchos sistemas de laboratorios de referencia intercambian datos con sistemas de laboratorios de hospitales utilizando este estándar. Las conexiones entre un SIH y un SIL utilizan a menudo el estándar E 1238 o un subconjunto similar al definido por el HL7. Estos estándares hospitalarios para el intercambio de



información conllevan profundas implicaciones para el SIL, ya que ofrecen grandes beneficios con un costo adicional bajo. Por ejemplo, se produce un ahorro importante cuando los médicos realizan directamente la entrada de la petición y recuperan los resultados electrónicamente, tarea que requiere la integración del SIH y el SIL. El objetivo final de la integración es la migración hacia una reducción del uso de papel y hacia la historia electrónica del paciente. Esto será difícil hasta que la terminología médica se vuelva más consistente. [refs\(321\)](#)

Directrices futuras

Los cambios rápidos en la tecnología del laboratorio, la economía sanitaria, y la tecnología informática forzarán una evolución continua de los sistemas del laboratorio. Por ejemplo las pruebas en el lugar de atención al paciente (PLAP) han surgido de aquellas situaciones que requieren un tiempo rápido de respuesta. Sin embargo, muchos dispositivos de PLAP están actualmente limitados en su posibilidad de interaccionar con un SIL produciendo conflictos con las regulaciones que requieren una adecuada documentación de los resultados y de otros parámetros asociados con los análisis. Los resultados de las PLAP están raramente documentados en la historia del paciente, si es que hay algo. Mas a menudo los resultados son utilizados por personal clínico sin información debido a las restricciones que imponen el tiempo y el trabajo. En comparación los resultados introducidos en el SIL o el SIH están disponibles para ser utilizados por todo el personal clínico.

El Institute of Medicine [ref\(322\)](#) y el Government Accounting Office, [ref\(323\)](#) junto con usuarios y proveedores de ordenadores, [ref\(324\)](#) han propuesto las historias médicas informatizadas como una vía eficaz para reducir costos. El éxito en la informatización del laboratorio clínico y la disponibilidad de un gran número de documentos de pacientes en formato electrónico mediante una utilización diseminada de los procesadores de texto han contribuido a este propósito. La historia médica electrónica de acuerdo con sus proponentes haría más fácil la transferencia de información entre los usuarios de las historias con una relación mejor costo-eficacia. [ref\(325\)](#) Unida con la entrada de peticiones y las directrices de práctica médica, puede estructurarse la atención al paciente con un beneficio máximo. La falta de una terminología médica común, la política asociada con cualquier proyecto grande, la dificultad de entrada de datos críticos como los asociados con la atención de enfermería y el alto costo y el desafío tecnológico de desarrollar programas complejos hacen de esto una gran meta. [refs\(326\)](#)

Posiblemente el mayor potencial para cambiar la interacción entre el hombre y el ordenador procede de las nuevas tecnologías informáticas que se están introduciendo actualmente. Esta tecnología incluye dispositivos de reconocimiento de voz, unidades de respuesta por voz y placas portátiles que permiten la escritura manual. Estas tecnologías tienen la ventaja potencial de ser más fáciles de usar que el teclado, pero la fiabilidad de estos dispositivos debe aumentar antes de que sean aceptados para su utilización en muchas áreas del laboratorio clínico.

El uso del ordenador en el laboratorio clínico está aún en etapa de desarrollo. El potencial de los sistemas de SIL para gestionar el flujo de la automatización necesario para conseguir una buena atención al paciente y para ayudar a gestionar eficazmente los recursos necesarios (costos) se ha utilizado escasamente. Podemos imaginar un futuro donde la informática sea tan importante como el resultado analítico.



Referencias

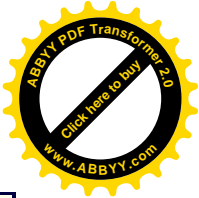
1. Sittig DF, Stead WW: Computer-based physician order entry: the state of the art, *JAMA* 1(2):108-123, 1994.
2. Weilert M, Tilzer LL: Putting bar codes to work for improved patient care, *Clin Lab Med* 11:227-238, 1991.
3. EIA standard RS-232-C, Washington, D.C., 1969, Electronic Industries Association.
4. ASTM designation E1381-91, specification for low-level protocol to transfer messages between clinical laboratory instruments and computer systems, *1994 Annual book of ASTM standards*, vol 14.01, Philadelphia, 1994, American Society for Testing and Materials, pp 311-317.
5. ASTM designation E1381-91, specification for low-level protocol to transfer messages between clinical laboratory instruments and computer systems, *1994 Annual book of ASTM standards*, vol 14.01, Philadelphia, 1994, American Society for Testing and Materials, pp 311-317.
6. ASTM designation E1466-92, standard specification for use of bar codes on specimen tubes in the clinical laboratory, *1994 Annual book of ASTM standards*, vol 14.01, Philadelphia, 1994, American Society for Testing and Materials, pp 407-409.
7. Westgard JO, Barry PL, Hunt MR, et al: A multi-rule Shewhart chart for quality control in clinical chemistry, *Clin Chem* 27:493-501, 1981.
8. Ladensen JH: Patients as their own controls: use of the computer to identify "laboratory error," *Clin Chem* 21:1648-1653, 1975.
9. Lezotte D, Grams RR: Determining clinical significance in repeated laboratory measurements-the "clinical delta range," *J Med Systems* 3:175-191, 1979.
10. Koss W, Sodeman T: The workload recording method: a laboratory management tool, *Clin Lab Med* 12:337-350, 1991.
11. Carlton J, Hays L: New computer chip hits desktop market with Intel in its sights, *Wall Street Journal* 75(102):A1, A4, 1994.
12. Friedman B, Mitchell W: Horizontal and vertical integration in hospital laboratories and the laboratory information system, *Clin Lab Med* 10:627-641, 1990.
13. Bakker AR: Security in medical information systems. In Bemmell JH, McCray AT, editors: *1993 Yearbook of medical informatics, sharing knowledge and information*, Stuttgart, Germany, 1993, Schattauer, pp 52-60.
14. Gostin LO, Turek-Brezina J, Powers M, et al: Privacy and security of personal information in a new health care system, *JAMA* 270 (20):2487-2493, 1993.
15. Department of Health and Human Services, Health Care Financing Organization, Department of Health and Human Services, 42 CFR part 405 et al: *Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988*, Final Rule, Fed Register 57(40):7001-7288, 1992.
16. Parkman PD: FDA letter to registered blood banks on recommendations for implementation of computerization in blood establishments, April 6, 1988.
17. Application of the medical device GMPS to computerized devices and manufacturing processes: medical device GMP guidance for FDA investigators, first draft, Office of Compliance and Surveillance, Division of Compliance Programs, Food and Drug Administration, Public Health Service, Department of Health and Human Services, Rockville, Md., Nov 1990.
18. Butch SH: Computer software quality assurance, *Lab Med* 22:18-22, 1991.
19. Commission on Laboratory Accreditation: *Inspection Checklist*, Section 1, Laboratory general -computer services, College of American Pathologists, Northfield, Ill., 1993.
20. Elevitch F, Treling C, Spackman K, et al: A clinical laboratory information systems survey: a challenge

- for the decade, *Arch Pathol Lab Med* 117:12-21, 1993.
21. ASTM designation E1238-94, standard specification for transferring clinical laboratory data messages between independent computer systems, *1994 Annual book of ASTM standards*, vol 14.01, Philadelphia, 1994, American Society for Testing and Materials, pp 132-210.
22. McDonald CJ, Hammond WE: Standards formats for electronic transfer of data, *Ann Intern Med* 110:333-335, 1989.
23. McDonald CJ: *Standards for the electronic transfer of clinical data: progress, promises, and the conductor's wand*, Proceedings of the 14th Annual Symposium on Computer Applications in Medical Care, Los Alamitos, Calif., 1990, IEEE Computer Society Press, pp 9-14.
24. GAO/IMTEC-93-17, *Automated medical records-leadership needed to expedite standards development*, Washington, D.C., 1993, General Accounting Office.
25. deMoor GJE: Standardization in medical informatics. In Bemmell JH, McCray AT, editors: *1993 Yearbook of medical informatics, sharing knowledge and information*, Stuttgart, Germany, 1993, Schattauer, pp 61-66.
26. Dick RS, Steen EB, editors: *The computer-based patient record, an essential technology for health care*, Washington, D.C., 1991, National Academy Press.
27. GAO/IMTEC-91-5, *Medical ADP systems-automated medical records hold promise to improve patient care*, Washington, D.C., 1991, General Accounting Office.
28. Korpman R: Health care information systems: patient-centered integration is the key, *Clin Lab Med* 11:203-220, 1991.
29. Barnett GO, Jenders RA, Cheuh HC: The computer-based clinical record-where do we stand? *Ann Intern Med* 119:1046-1048, 1993.
30. Brooks F: *The mythical man month: essays on software engineering*, Reading, Mass., 1979, Addison-Wesley.
31. Brooks F: No silver bullet: essence and accidents of software engineering, *IEEE Computer* 20:10-19, 1987.

Figuras



Figura 18-1 Ejemplo de una etiqueta de un especimen marcado con código de barras. El número del especimen de seis dígitos (398291) está codificado en barras. El número



del paciente, datos demográficos, hora/fecha, y tipo de prueba están escritas en forma legible a la vista.

LA FUNDACIÓN CLÍNICA DE CLEVELAND
División de Patología y Laboratorio de Medicina
Departamento de Patología Clínica
9500 Eudid Avenue, Cleveland, Ohio 44195

REPORTE DE LABORATORIO

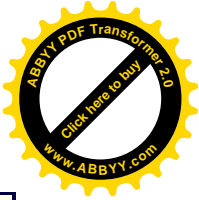
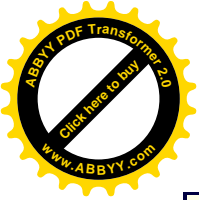
Página 2
1/29/93
21:42

LOCALIZACIÓN DEL PACIENTE G110-06 F15	NÚMERO	NOMBRE Gladys M	EDAD 78Y	SEXO F	CATEGORÍA O
MÉDICO PRINCIPAL:	04019	MILLER, PAUL			
FECHA DE ADMISIÓN:	01/25/93				DADO DE ALTA: 01/29/93

***** CUENTA SANGUÍNEA *****

	WBC	RBC	HGB	HCT	PLTCT	MCV	MCH	MCHC
Rango de Ref:	4.0	4.2	12	37	150.0	80	27	32
UNIDAD:	11.0	5.4	16	47	400.0	100	34	36
	K/UL	M/UL	G/DL	%	K/UL	FL	PG	G/DL
FECHA HORA								
0126 0800	8.30	4.18*	9.9*	32.6	275	77.9*	23.6*	30.2*
0126 1825	9.53	3.83*	8.7*	30.2*	264	78.8*	22.8*	28.9
0127 0900			10.0*	33.8*				
0127 1600			10.7*	33.3*				
0128 0400	7.71	4.01*	9.9*	32.3*	236	78.0*	24.7*	31.7*
0128 1605			9.7*	32.6*				
0129 0500	8.43	4.20	9.6*	32.7*	225	77.9*	22.8*	29.3*
0129 1430			11.3*	35.7*				

Figura 18-2 Un ejemplo de reporte de paciente acumulativo



LA FUNDACIÓN CLÍNICA DE CLEVELAND

División de Patología y Laboratorio de Medicina
Departamento de Patología Clínica
9500 Euclid Avenue, Cleveland, Ohio 44195

REPORTE DE LABORATORIO

Página 1
9/15/93
03:56

LOCALIZACIÓN DEL PACIENTE F25	NÚMERO	NOMBRE Catherine	EDAD 62Y	SEXO F	CATEGORÍA O
-------------------------------------	--------	---------------------	-------------	-----------	----------------

MEDICO QUE ATENDIÓ: 00300 HUEPLER, FREDERICK A

SPC-#/COLL	PRUEBA	RESULTADO	UNIDAD	RANGO DE REF.	COMENTARIOS
259024 A 9/13 09:21	SMA-16	PERFIL			
	TP	8.8*	G/DL	6.0-8.0	
	ALB	4.9	G/DL	3.5-5.0	
	CA	9.5	MG/DL	8.5-10.5	
	PHOS	3.6	MG/DL	2.5-4.5	
	GLUCOSE	88	MG/DL	65-110	
	URIC A	6.8	MG/DL	2.0-7.0	
	T BILI	0.3	MG/DL	0-1.5	
	ALK P	167*	U/L	20-120	
	LD	164	U/L	100-220	
	AST	17	U/L	7-40	
	NA	138	MMOL/L	134-145	
	K	4.2	MMOL/L	3.5-5.0	
	CL	106	MMOL/L	98-108	
	CO2	21*	MMOL/L	24-32	
	BUN	53*	MG/DL	8-25	
	CREAT	1.9*	MG/DL	0.7-1.4	

Figura 18-3 Un ejemplo de un reporte de paciente no acumulativo



Figura 18-4 Base de datos con relaciones jerárquicas. Estos datos están organizados de

manera que puedan recuperarse por identificación del paciente como el principal índice inicial.



Figura 18-5 Base de datos con relaciones de datos en red. Los datos son organizados de manera que puedan recuperarse por paciente o por resultados anormales.

Para una relacion de datos que tiene la estructura siguiente:

{paciente -1, fecha -1, sodio -1, potasio -1, calcio -1, TSH -1}

{paciente -2, fecha -2, sodio -2, potasio -2, calcio -2, TSH -2}

{paciente -3, fecha -3, sodio -3, potasio -3, calcio -3, TSH -3}

:

Los datos aparecen como una tabla:

PACIENTE	FECHA	SODIO	POTASIO	CALCIO	TSH
James Smith	10/3/87	144mEq/L	4.5 mEq/L	10.1mg/dL	ninguno
James Smith	10/20/87	138mEq/L	ninguno	ninguno	3.4μU/mL
John Jones	11/30/87	154mEq/L	ninguno	ninguno	ninguno

Figura 18-6 Estructura y datos de elementos e una base de datos en una base interrelacionada. Los datos pueden ser recuperados por columnas o filas sencillas o por una combinación de columnas y filas.

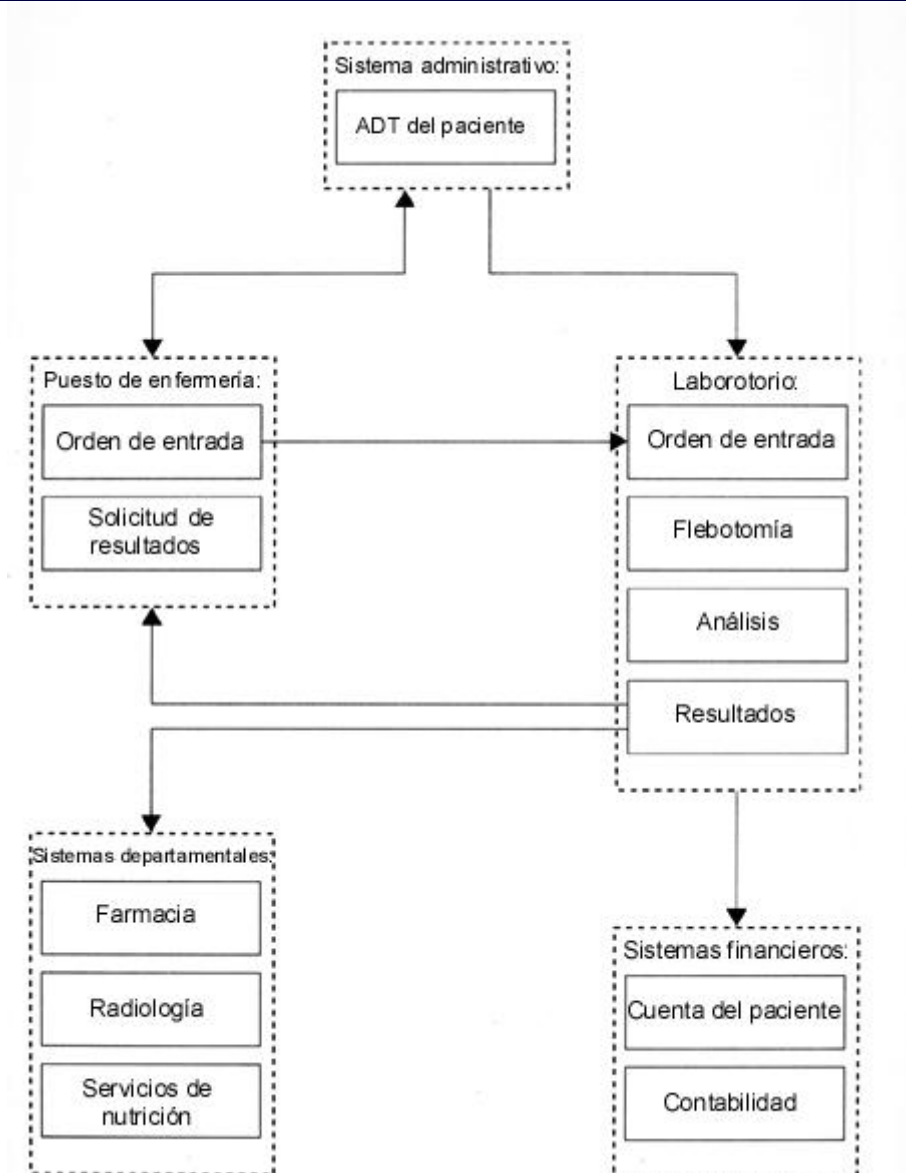
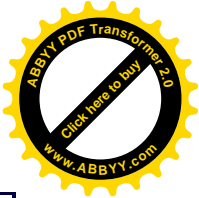


Figura 18-7 Intercambio de información entre los sistemas computarizados en un ambiente hospitalario. Actualmente, es deseable que la mayoría de los sistemas computarizados de laboratorio interaccionen con los sistemas administrativos, financieros, de enfermería y otros sistemas departamentales.

CAPÍTULO 19

19. Estadística para Laboratorio

Stephen E. Kahn



Mark A. Jandreski

Distribuciones poblacionales

Poblaciones y muestras

Distribuciones de frecuencia

Estadísticas de distribución básicas

Medidas de tendencia central

Medidas de dispersión

Intervalos de confianza

Medidas de exactitud y precisión

Comparaciones paramétricas de poblaciones

Hipótesis nula y significancia estadística

Comparación de la variación aleatoria (precisión): la prueba de F

Comparación de medias (exactitud o sesgo): la prueba de t

Análisis de varianza unidireccional (ANOVA)

Identificación de valores atípicos en una muestra utilizando la prueba de diferencias

Comparaciones no paramétricas de poblaciones

Estadísticas de distribución no paramétricas

Prueba del signo

Prueba de suma de rangos de Mann y Whitney

Análisis de χ^2 (Ji-Cuadrada)

Regresión lineal y correlación

Estadísticas básicas de regresión lineal simple y correlación

Prueba para valores alejados utilizando análisis residual

Limitaciones del análisis de regresión lineal simple

OBJETIVOS

- ♦ Construir un histograma de frecuencias y un histograma de frecuencias relativas utilizando la información adecuada
- ♦ Mencionar tres medidas de tendencia central y describir su utilidad cuando se aplican a distribuciones normales y no normales.
- ♦ Mencionar tres medidas de variación, calcular los valores de cada una utilizando los datos apropiados, y describir su utilidad cuando se aplican a distribuciones normales y no normales.
- ♦ Señalar el porcentaje de valores que se encuentran dentro de los intervalos de confianza $\pm 1s$, $\pm 2s$ y $\pm 3s$ en una población de distribución normal.
- ♦ Describir tres métodos paramétricos para comparar poblaciones y su utilidad cuando se aplican a

distribuciones normales.

- ♦ Describir tres métodos no paramétricos para comparar poblaciones y su utilidad cuando se aplican a distribuciones normales y no normales
- ♦ Explicar el uso del ANOVA
- ♦ Describir los usos y limitaciones del análisis de regresión para comparar grupos de observaciones.

Términos clave

amplitud La diferencia entre la observación de mayor valor numérico y la observación de menor valor numérico en una población.

análisis de varianza Método estadístico para la comparación de tres o más medias. Se le conoce ampliamente bajo su abreviatura inglesa ANOVA por "Analysis of Variance."

coeficiente de correlación Estadística que mide la distribución de los datos alrededor de una línea estimada de regresión lineal.

coeficiente de variación (CV) Una desviación estándar relativa en la que la desviación estándar se divide entre la media y se multiplica por 100%.

desviación estándar Raíz cuadrada de la varianza.

distribución gaussiana Ver *distribución normal*.

distribución normal Una población de observaciones que tiene la tendencia a agruparse simétricamente alrededor de un valor central, de forma que la media, la media y la moda de los datos son iguales; también se conoce como distribución gaussiana.

error aleatorio Error que afecta la reproducibilidad de un método (precisión).

error estándar Término que se utiliza para describir la variabilidad que resulta de tomar una muestra de una población.

error sistemático Error no aleatorio que afecta la media de una población de observaciones y define el sesgo entre las medias de dos poblaciones (ver *exactitud*).

estadístico Número que describe una propiedad de una serie de observaciones u otros números.

estadística La ciencia que estudia el uso y clasificación de números u observaciones.

estadísticas no paramétricas Estadísticas que se emplean cuando la suposición de una distribución normal o simétrica (gaussiana) de los datos no es válida.

estadísticas paramétricas Estadísticas empleadas cuando la suposición de que una población tiene una distribución simétrica de las observaciones (como la gaussiana o log-normal) es válida.

exactitud Estimador del sesgo sistemático no aleatorio que existe entre muestras de observaciones o entre una muestra de observaciones y el verdadero valor en la población.

grados de libertad (gl) El número de observaciones independientes en un conjunto de datos. Es el número de observaciones menos el número de restricciones para un conjunto de datos.

hipótesis nula La hipótesis de trabajo de una prueba estadística que afirma que no existe diferencia entre las estadísticas de dos poblaciones diferentes.

histograma Representación gráfica de los datos en la cual la frecuencia de cierto valor (o intervalo de valores) se grafica contra una escala de todos los valores.

intervalo de confianza Intervalo dentro del cual una estadística determinada experimentalmente tiene una probabilidad conocida de incluir el parámetro verdadero.

Ji-cuadrada (χ^2) Prueba estadística que mide la diferencia entre las frecuencias de ocurrencia observada y esperada en dos o más poblaciones.

media Promedio aritmético de un conjunto de observaciones.

mediana Un valor o intervalo que se encuentra en medio de una población, la mitad de la cual se encuentra por arriba y la mitad por debajo de la mediana.

moda El valor o intervalo de una población que ocurre con la mayor frecuencia.

precisión Término que se utiliza para describir la variación aleatoria en una población de observaciones.

prueba del signo Prueba estadística no paramétrica que se utiliza para evaluar las diferencias entre medianas poblacionales.

prueba de Mann y Whitney Prueba estadística no paramétrica que se basa en los rangos de los datos y se utiliza para probar la hipótesis nula de que las tendencias centrales de dos poblaciones independientes son idénticas.

prueba de F Prueba estadística para determinar si existen diferencias entre dos varianzas.

prueba de t Prueba estadística que se utiliza para determinar si existen diferencias entre dos medias o entre un valor objetivo y una media calculada en poblaciones que tienen distribuciones normales.

tendencia central El valor sobre el cual se centra una población. La media, la mediana y la moda se utilizan para describir la tendencia central de una población.

valor atípico Un resultado o valor puntual que se encuentra muy alejado del intervalo de todos los otros resultados o puntos. No se considera que este valor pertenezca a la población de la que ha sido muestreado.

varianza Estadístico que se utiliza para describir la distribución o dispersión de las observaciones en una población.

La generación de los resultados de las pruebas, la utilización de procedimientos efectivos de control de calidad, el control del desempeño de los métodos existentes y la evaluación de la utilidad de nuevos métodos de análisis, son actividades analíticas de rutina que se llevan a cabo en el laboratorio clínico. Todas las técnicas y métodos analíticos se encuentran sujetos a varios tipos de errores, o variación, que crean un grado de incertidumbre en los resultados de análisis cuantitativos generados en un laboratorio. El laboratorista clínico debe ser capaz de aplicar técnicas estadísticas básicas a fin de evaluar la validez de los resultados analíticos. La estadística es, por tanto, una herramienta importante de laboratorio.

Webster^{ref(327)} define la estadística como "(1) una rama de las matemáticas que trata la colecta, análisis, interpretación y presentación de multitud de datos numéricos, y (2) una colecta de datos cuantitativos."

Una estadística es un número que describe alguna propiedad de un conjunto de otros números. En el laboratorio clínico, las descripciones estadísticas de conjuntos de datos pueden ser útiles en varias formas:

1. Para identificar como se distribuye una población de datos.
2. Para evaluar la variación aleatoria en una población de datos.
3. Para comparar las magnitudes de variación aleatoria dentro de las poblaciones de datos.
4. Para analizar que parámetros son componentes significativos de la varianza.

5. Para analizar la existencia de una diferencia sistemática entre poblaciones de datos.
6. Para evaluar el grado de correlación entre poblaciones de datos.

Este capítulo describe cada uno de estos usos de la estadística, e ilustra como pueden aplicarse de manera efectiva a situaciones de laboratorio.

El conocimiento básico y teórico de los métodos estadísticos apropiados es de importancia crítica en el laboratorio de química clínica. De igual importancia es la aplicación correcta de los métodos estadísticos para problemas relevantes de laboratorio. Se recomienda consultar libros de texto de estadística básica, tales como las referencias 2 a la 8, para una comprensión de la estadística más amplia que la que se presenta en este capítulo.

Distribuciones Poblacionales

Poblaciones y muestras

El término *población* se utiliza a menudo para referirse a un número de criaturas animadas o personas, tales como los habitantes de los Estados Unidos. Sin embargo, en estadística, población también se refiere a una colección de objetos, eventos, procedimientos u observaciones. Por ejemplo, se podría considerar como una población de valores de glucosa a todos los valores de glucosa sérica de todas las personas que residen en Chicago en un día dado. Como segundo ejemplo, si la concentración de glucosa de un solo espécimen se midiera 10,000 veces, se obtendría una población de resultados de glucosa con ligeras diferencias, puesto que ninguna medición química es exacta, debido a la variación aleatoria inherente a todas las mediciones de laboratorio.

El número de observaciones en los ejemplos anteriores es muy grande para ser estudiado de manera conveniente; por lo tanto, para hacer una investigación debe obtenerse una muestra representativa de la población. Antes de tomar la muestra, debe describirse cuidadosamente a la población de la que proviene. Una vez que se conocen los atributos de la población, se pueden aplicar criterios de muestreo para variables tales como edad, sexo, ocupación, historia familiar, estado de salud, o cualquier otro parámetro relevante para el estudio. Por ejemplo, para llevar a cabo un análisis del intervalo de referencia de glucosa sérica, no se pueden utilizar muestras de suero de pacientes diabéticos. Debe definirse también el número de observaciones individuales que serán necesarias. Si el número es muy grande, puede ser muy difícil llevar a cabo el estudio. Si el número es muy pequeño, la muestra puede no ser una representación estadísticamente significativa de la población. La muestra debe seleccionarse de tal manera que puedan hacerse inferencias verdaderas sobre la población bajo estudio a partir de los resultados obtenidos de la misma. La mayor parte de los conceptos que se discuten en este capítulo se enfocan en la evaluación estadística de muestras de datos obtenidos de una población.

Distribuciones de frecuencia

De manera conceptual, la forma más simple de describir una población de datos es tal vez construir un *histograma*, también llamado *polígono de distribución de frecuencias*. Un histograma muestra la frecuencia o el número de veces que un valor particular o intervalo de valores se obtiene, frente la escala de todos los valores. La Fig. 19-1, A muestra un histograma de 20 resultados de glucosa obtenidos de la medición repetida de un espécimen individual de sangre. El eje horizontal es la concentración de glucosa dividida en pequeños

intervalos o barras. El eje vertical es la frecuencia (o frecuencia relativa) de los resultados que se obtienen en cada barra, tal como el número de pacientes que tienen un intervalo dado de valores de glucosa. Cuando se utilizan frecuencias relativas, la frecuencia de cada barra se presenta como un porcentaje del número total de muestras. El eje horizontal del histograma también puede representar percentiles acumulados (porcentaje acumulado de la población hasta e incluyendo cada barra), así como unidades de concentración. Cuando el número de observaciones N es pequeño y las barras son relativamente amplias, el histograma tiene una apariencia tajante (Fig. 19-1, A). Conforme N se incrementa y las barras se hacen más estrechas, la forma del histograma se suaviza y éste se vuelve más representativo de la población (Fig. 19-1, B). A medida que N aumenta, el histograma toma la apariencia de una función continua (Fig. 19-1, C). En el histograma de observaciones hipotéticas de glucosa de la Fig. 19-1, C, se puede apreciar que la población se centra alrededor de 1000 mg/L con pocas observaciones menores de 920 mg/L y pocas mayores de 1080 mg/L. También puede evaluarse la dispersión general de los datos.

Si existen suficientes datos representados en el histograma y si las observaciones son verdaderamente aleatorias (esto es, si cada resultado es afectado solo por procesos aleatorios), el histograma se puede utilizar para predecir la probabilidad de que los resultados que se obtengan en el futuro se encuentren por arriba o por debajo de cierto valor. La Fig. 19-1, C muestra que hay una probabilidad de 2.3% de que un resultado de glucosa que se obtenga en el futuro sea menor de 920 mg/L, y una probabilidad de 2.3% de que éste sea mayor de 1080 mg/L.

La curva a la que se aproxima el histograma de glucosa en la Fig. 19-1, C, es una curva suavizada “con forma de campana” llamada distribución *gaussiana* o *normal*, representada en la Fig. 19-2. Esta curva simétrica fue descrita primero por el matemático francés Abraham de Moivre en 1733 y desarrollada posteriormente por el astrónomo matemático Karl Friedrich Gauss durante el siglo XIX. La porción de la curva hacia el lado derecho se conoce comúnmente como la *cola superior* y la porción hacia la izquierda se denomina la *cola inferior*. Muchas variables aleatorias de interés en medicina y atención a la salud, como los intervalos de referencia, tienen distribuciones similares a la normal.

Las pruebas estadísticas *paramétricas* que se discuten en este capítulo se utilizan bajo la suposición de que la población a estudiar se distribuye de manera gaussiana. Antes de proceder con las comparaciones estadísticas paramétricas, es importante establecer si la población se encuentra distribuida normalmente. Se puede utilizar *papel de probabilidad normal* para hacer un análisis gráfico y probar la existencia de una distribución normal. Sin embargo, este método requiere una evaluación visual para determinar si los datos de la muestra se desvían de una línea recta, y por tanto puede ser muy subjetivo. La gráfica se construye trazando los valores de las barras, tales como la concentración de glucosa, a lo largo del eje lineal x y la frecuencia acumulada de la distribución en el eje no lineal y , cuya función matemática se basa en una distribución normal. La Fig. 19-1, D muestra una gráfica de probabilidad normal para 600 valores de glucosa obtenidos a partir de un grupo de voluntarios sanos.

La *prueba de Kolmogorov-Smirnov* se puede utilizar para probar la existencia de una distribución normal de los datos. Este análisis mide las distancias verticales entre la distribución acumulada y la línea recta trazada en papel de probabilidad normal. Los valores críticos para determinar la existencia de una diferencia estadísticamente significativa se



obtienen de una tabla estadística.

Otra forma de medir que tan bien se ajustan los datos a una distribución normal es calcular los *coeficientes de sesgo y curtosis*. El sesgo mide la asimetría de la distribución de los datos. Los valores mayores de cero indican que la cola superior de la curva es más larga que la cola inferior. Los valores negativos indican que la cola inferior es más larga. La curtosis mide que tan pronunciada o plana es la distribución con respecto a una distribución normal verdadera. Los coeficientes de curtosis mayores de cero indican que la curva es pronunciada en el centro y que las colas son relativamente largas. Los valores menores de cero indican que la curva es plana en el centro y que las colas son cortas. Cuando los datos tienen una distribución razonablemente gaussiana, los coeficientes de sesgo y curtosis deben estar entre 1 y -1. Existen diferentes tipos de coeficientes llamados *sesgo estándar* y *coeficientes de curtosis* que prueban la existencia de desviaciones significativas de la distribución normal y, de manera análoga a la desviación estándar, deben estar entre 2 y -2 para datos normalmente distribuidos.^{ref(328)} A menudo, estos cálculos se llevan a cabo utilizando programas informáticos.

Cuando se observa una distribución no simétrica o no gaussiana, una opción es *transformar* esta distribución a una más normal. Esto se puede llevar a cabo mediante la conversión de los valores poblacionales a otra forma. Los métodos de transformación incluyen tomar el logaritmo (base 10 o natural) de los datos, tomar el recíproco de los datos y elevar los números exponencialmente. Después de utilizar uno de esos métodos, el conjunto de datos resultantes se distribuye a menudo de manera normal. Si aún así los datos no se distribuyen normalmente, se utilizan pruebas estadísticas *no paramétricas* para analizarlos. En las áreas médica y de atención a la salud, las distribuciones no paramétricas tienen con frecuencia forma *sesgada o bimodal*. Como se señaló previamente, una distribución sesgada es aquella en la que una cola, ya sea la superior o inferior es más larga que la otra (Fig. 19-3). Los valores del intervalo de referencia para la gama-glutamyltransferasa sérica que se obtienen de individuos sanos se encuentran a menudo sesgados hacia la derecha. Una distribución bimodal se observa cuando los datos provienen de dos poblaciones relacionadas (Fig. 19-4). Los datos combinados del intervalo de referencia de ácido úrico sérico que se obtienen de hombres y mujeres sanos presentan típicamente una distribución bimodal cuando se representan gráficamente de manera apropiada. Este tipo de distribución con frecuencia indica que deben establecerse intervalos de referencia separados por sexo para el compuesto bajo estudio.

Estadísticas de Distribución Básicas

En la sección anterior fue posible apreciar que la representación gráfica de un histograma o una distribución de frecuencia es un método simple para describir visualmente una población de datos y evaluar, al menos de manera inicial, si éste se distribuye de manera gaussiana o no gaussiana. Existen dos categorías generales de estadísticos que se pueden utilizar también para describir la distribución de los datos. Estas dos categorías son las medidas de tendencia central y las medidas de dispersión.

Medidas de tendencia central

Las medidas de tendencia central son estadísticas que representan algún valor central alrededor del cual se distribuyen los datos. Las tres medidas de tendencia central que se calculan con frecuencia para aplicaciones de laboratorio clínico son la media, la mediana y la moda.

La *media* es probablemente la estadística utilizada más ampliamente y es simplemente un *promedio aritmético*. La media se calcula por la adición de todas las observaciones y dividiendo por el número de observaciones N . Para una muestra de datos, el cálculo de la media, designada como \bar{x} , se ilustra en la ecuación 19-1, donde x_i es una observación individual:

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{N} \quad \text{Ec. 19-1}$$

Si se utiliza la población completa de datos para calcular la media, ésta es la media poblacional, indicada por el símbolo " μ ". Para aplicaciones de laboratorio clínico, a menudo es imposible coleccionar la población completa de datos (esto es, siempre se puede hacer otra medición a menos que la población esté definida de manera restringida). Para esas aplicaciones es apropiado el uso del símbolo para la media muestral \bar{x} . Esta convención indica que un subgrupo de los datos poblacionales se utilizó para calcular \bar{x} , que es un estimador de la verdadera media poblacional.

Si los datos de la muestra se distribuyen simétricamente alrededor de la media, la media aritmética representa realmente la tendencia central de la muestra. Esta característica se ilustra en la Fig. 19-1, D, que muestra una distribución *normal* o *gaussiana*. Pero cualquier muestra de datos de una población tendría una media sea su distribución gaussiana o no gaussiana.

Una segunda medida de tendencia central es la *moda*. La moda de una muestra de datos es aquel valor que se observa más frecuentemente. Es el valor en el pico de la distribución de frecuencia (Fig. 19-3). Si una distribución de frecuencia tiene dos picos, la distribución es bimodal. Un ejemplo de distribución bimodal se presenta en la Fig. 19-4. Para aplicaciones prácticas en el laboratorio, toda distribución de frecuencia tiene un mínimo de una moda (esto es, la distribución es al menos unimodal).

Una tercera medida de tendencia central es la *mediana*. La mediana es el valor medio en una muestra de datos cuando todos los valores en la distribución se ordenan individualmente del menor al mayor (o viceversa). A diferencia de la media y la moda, el valor mediano describe la verdadera tendencia central para todos los tipos de distribuciones, puesto que la mitad de las observaciones son mayores que la mediana y la mitad son menores.

Una característica de una distribución normal perfecta es que el promedio aritmético es el valor que se observa con mayor frecuencia y también es el valor medio observado en la muestra cuando los valores se ordenan de menor a mayor. Como se ilustra en la Fig. 19-1, D, esto da como resultado que la media, la mediana y la moda tengan todas el mismo valor. Las tres estadísticas son verdaderas medidas de tendencia central en una distribución gaussiana o normal.

En contraste, en una distribución no normal, como la que se muestra en la Fig. 19-3, la media, la mediana y la moda tienen todos valores diferentes. La media no describe

exactamente el centro de la distribución (aunque sigue siendo el promedio aritmético de los datos). También es aparente que la moda de esta distribución no describe una verdadera tendencia central de la muestra de datos. La mediana es el único valor que puede considerarse una verdadera medida de la tendencia central de esta distribución. Para estas distribuciones no normales donde la media y la mediana pueden ser considerablemente diferentes, puede ser más apropiado utilizar ambos valores, o solo la mediana, para describir la tendencia central de la distribución.

Existe una limitación significativa y con frecuencia ignorada en el uso de valores medios para describir muestras de datos, aún cuando esas muestras se encuentren distribuidas normalmente. Las medias pueden ser influidas fuertemente por valores en los datos que yacen en los extremos del intervalo. Esta característica indica que cuando se calcula un valor medio para una muestra de datos, se debe ser crítico al evaluar que valores pueden no ser representativos del conjunto de observaciones, esto es, que valores son atípicos y que por tanto deben ser excluidos mediante el uso de técnicas apropiadas (ver adelante). La mediana se afecta menos que la media por valores extremos en el conjunto de datos.

Medidas de dispersión

Además de las medidas de tendencia central, otras clases de datos estadísticos se requieren para caracterizar efectivamente una muestra de datos o una distribución. Las medidas de tendencia central no proporcionan suficiente información de que tan cercanos o alejados se encuentran los valores en una muestra de datos. Las estadísticas que indican el grado con el que los valores observados varían, o la dispersión de la distribución, son las medidas de dispersión. Tres medidas de dispersión que se calculan frecuentemente en aplicaciones de laboratorio clínico son la amplitud, la varianza y la desviación estándar.

La *amplitud* es simplemente la diferencia entre los valores mayor y menor en la muestra de datos. La amplitud es útil para indicar la dispersión de las observaciones cuando N es pequeña, pero cuando ésta se utiliza no es posible hacer suposiciones en relación a la forma de la distribución. Una limitación de la amplitud como medida de variación es que esta basada solamente en dos valores de la muestra de datos.

La *varianza* y la *desviación estándar* son medidas más útiles de variación. La varianza se calcula determinando primero la media de la muestra de datos y después substrayendo la media a cada valor para obtener N diferencias. Los cuadrados de las diferencias entre los valores individuales (x_i) y la media se suman. La suma de las diferencias elevada al cuadrado se divide entre $N - 1$, lo que da la varianza (ecuación 19-2,A):

$$\text{Varianza} = s^2 = \frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{N} \quad \text{Ec. 19-2, A}$$

La *desviación estándar* (s) es la raíz cuadrada de la varianza y se representa con frecuencia como DS . El denominador de la ecuación 19-2 A es $N - 1$ en lugar de N puesto que solamente hay $N - 1$ grados de libertad para la varianza una vez que \bar{x} se ha utilizado para calcular la varianza. El concepto de grados de libertad se explica de manera más extensa posteriormente en este capítulo.

Aunque s se calcula normalmente utilizando los resultados de un solo análisis, con frecuencia se necesita saber la imprecisión de análisis replicados. Para calcular este estimado



de la variación, se puede emplear la siguiente ecuación:

$$s_{rep} = \left(\frac{\sum d^2}{N} \right)^{1/2} \quad \text{Ec. 19-2, B}$$

donde d es la diferencia entre las mediciones replicadas. Este cálculo puede ser útil para determinar si los análisis duplicados pueden ayudar a alcanzar el nivel deseado de imprecisión intraserial (dentro de una corrida) de un ensayo.

Otra estadística que se calcula a menudo en aplicaciones de laboratorio es el *coeficiente de variación* o CV. El CV indica que porcentaje de la media está representado por la desviación estándar, como se ilustra en la ecuación 19-3:

$$\%CV = \frac{100\% s}{\bar{x}} \quad \text{Ec. 19-3}$$

Una ventaja de usar el CV para expresar la variación en los métodos analíticos es que ésta se reporta en unidades que son independientes del método analítico particular. Debe recordarse, sin embargo, que la magnitud del CV de un método analítico no es completamente independiente de la concentración. En ciertos casos, las estadísticas de rutina para dos niveles de materiales de control de calidad pueden indicar un CV mayor al nivel más bajo simplemente porque el numerador del cálculo del CV, la media, es un número menor que la media del nivel más elevado del material de control.

El Ejemplo 1 presenta el cálculo de las medidas básicas de tendencia central y las medidas básicas de dispersión utilizando datos de un solo nivel de un material de control de calidad.

Ejemplo 1. Cálculo de las estadísticas básicas utilizando una muestra de datos de mediciones repetidas de colesterol en un nivel de material de control de calidad.

Calcular la media, moda, mediana, varianza, desviación estándar y coeficiente de variación.

Muestra

x_i (mg/L)	$x_i - \bar{x}$	$(x_i - \bar{x})^2$
--------------	-----------------	---------------------



2080	-1.4	1.96
2090	8.6	73.96
2110	28.6	817.96
2100	18.6	345.96
2010	-71.4	5097.96
2090	8.6	73.96
2040	-41.4	1713.96
2140	58.6	3433.96
2070	-11.4	129.96
2070	-11.4	129.96
2100	18.6	345.96
2110	28.6	817.96
2030	-51.4	2641.96
2090	8.6	73.96
2080	-1.4	1.96
2060	-21.4	457.96
2170	88.6	7849.96
2060	-21.4	457.96
2130	48.6	2361.96
2090	8.6	73.96
2080	-1.4	1.96
2100	18.6	345.96
2000	-81.4	6625.96
2090	8.6	73.96
2040	-41.4	1713.96
2070	-11.4	129.96
2100	18.6	345.96
2080	-1.4	1.96

$$\Sigma = 58280 (x_i - \bar{x})^2 = (x_i - \bar{x})^2 = 36142.88$$

Media

$$= \bar{x} = \frac{\sum x_i}{N} = 2081.4 \text{ mg/L}$$

Mediana *

$$= 2085 \text{ mg/L}$$

Moda

$$= 2090 \text{ mg/L}$$

Medidas de Varianza

$$s^2 = \frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{N - 1}$$



$$= 36142.88/27 = 1338.6$$

$$s = 36.5 \text{ mg/L}$$

Intervalos de confianza

El uso de los valores de la media y la desviación estándar con el propósito de evaluar los resultados de control de calidad y la determinación de intervalos de referencia son aplicaciones importantes de laboratorio. Para usar esos estadísticos en estas aplicaciones, los datos de la muestra deben estar distribuidos normalmente. En una distribución normal, la desviación estándar y la media (que se encuentran en las mismas unidades) pueden utilizarse para describir la proporción de valores que caen dentro de un área dada bajo la curva normal.

El área total bajo la curva normal teóricamente representa todos los valores en la población dada. Como se ilustra en la Fig. 19-5, el área bajo la distribución normal perfecta de $+1s$ a $-1s$ representa el 68.3% de los valores, de $+2s$ a $-2s$ representa el 95.4% de los valores, y de $+3s$ a $-3s$ representa 99.7% de los valores. Esos intervalos que contienen un porcentaje definido de los datos se denominan *intervalos de confianza*. Para muestras de datos que se encuentran normalmente distribuidas, los intervalos de confianza calculados usando la media y la desviación estándar pueden ser utilizados para basar las reglas de control de calidad estadística en decisiones para aceptar o rechazar, en relación a series analíticas específicas (ver Capítulo 21).

Si los resultados del análisis del material de control de calidad discutidos en el Ejemplo 1 tuvieran una distribución perfecta, se esperaría que el intervalo entre la media más $2s$ y la media menos $2s$ (2008.4 a 2154.4 mg/L) excluyera 4.6% de los datos. En realidad, este rango excluye 7.1% de los datos (2 de 28 valores, 2000 mg/L y 2170 mg/L, se encuentran por fuera del intervalo de $2s$). Para esta muestra de datos, no era de esperarse que el intervalo $2s$ incluyera exactamente el 95.4% de los valores. Se sabía que la distribución no era perfectamente normal una vez que se obtuvieron resultados diferentes para la media, la mediana y la moda.

La medición de los niveles de colesterol en el Ejemplo 1 se caracteriza por cierto grado de imprecisión (el CV% es 1.75%). Puesto que el error de la medición de la media del grupo de valores es menor que el de una sola medición, mientras más veces se haga una medición más seguro se puede estar de su valor verdadero. Si se calculan varias medias a partir de diferentes grupos de mediciones de este espécimen de control de calidad, las medias individuales se distribuirán alrededor de la verdadera media poblacional. La variación aleatoria de este grupo de medias se describe como *error estándar de la media*, $s_{\bar{x}}$ en la ecuación 19-4:

$$s_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{N}}$$

Ec. 19-4

Suponga que para las mediciones de control de calidad de colesterol que se discutieron en el Ejemplo 1, se quisiera determinar el $s_{\bar{x}}$ y la probabilidad de que la media poblacional se encuentre dentro de un cierto intervalo. Poniendo los valores apropiados dentro de la ecuación 19-4:

$$s_{\bar{x}} = \frac{36.5 \text{ mg/L}}{\sqrt{28}} = 6.9 \text{ mg/L}$$

Se esperaría entonces que el 68.3% de las varias medias muestrales (con N de 28) estén dentro de 1×6.9 mg/L de la media poblacional (2074.5 a 2088.3 mg/L), 95.4% de las medias estén dentro de 2×6.9 mg/L de la media poblacional (2067.6 a 2095.2 mg/L), y 99.7% de las medias estén dentro de 3×6.9 mg/L de la media poblacional verdadera (2060.7 a 2102.1 mg/L). Por lo tanto, se puede asumir con un 95% de confianza que la media poblacional verdadera yace dentro del intervalo de 2067.6 a 2095.2 mg/L. A esto se llama el *intervalo de confianza al 95%*.

La verdadera concentración media de colesterol del material de control de calidad en el Ejemplo 1 no puede determinarse exactamente a menos que se hagan un número infinito de mediciones. En la práctica, se toma una muestra de la población donde se obtienen grupos de valores de control de calidad tales como los que se observan en el Ejemplo 1. La media que se obtiene no es, por lo tanto, la media verdadera sino un estimador de la media verdadera. El error estándar de la media derivada experimentalmente, \bar{x} , puede utilizarse para desarrollar un *intervalo de confianza* más exacto con una probabilidad conocida de incluir a la verdadera media poblacional, μ . Este intervalo se describe en la ecuación 19-5:

$$\mu = \bar{x} \pm t \cdot s_{\bar{x}}$$

Ec. 19-5

El valor de t se obtiene de una tabla de t (Tabla 19-1). El valor de t depende del número de grados de libertad ($N - 1$) y la probabilidad deseada, p , de que la media verdadera se encuentre fuera del intervalo de confianza debido solamente al azar. Una probabilidad de $p = 0.05$ implica una confianza del 95% [$100 \times (1 - p)\%$] de que el intervalo incluya a la media verdadera.

Los valores de t describen la misma distribución de probabilidad que se muestra en la Fig. 19-5, pero el uso de esta distribución debe ser bajo la suposición de que se conocen la media y desviación estándar verdaderas. El uso de la tabla de t permite disminuir la confianza en los valores estimados de los parámetros específicos al disminuir N . Por tanto, un uso apropiado de los valores de t es calcular intervalos de confianza más precisos para estadísticos que se obtienen de muestras pequeñas. El Ejemplo 2 presenta una ilustración de este caso. Para construir un intervalo de confianza que incluya a la media verdadera, debe asegurarse que la probabilidad al 0.05 de que esta media se encuentre más allá de los límites calculados se extienda sobre ambos extremos o colas de la distribución, como se muestra en la Fig. 19-6. Para estos propósitos, se utiliza un valor de t de dos colas, también denominado bilateral, $p = 0.05$. Para afirmar que la media verdadera es mayor que un solo límite, debe utilizarse un valor de t unilateral. Note que el valor de t para un intervalo de dos colas con una $p = 0.05$ es el mismo que el valor de t para un límite de una cola, también llamado unilateral con $p = 0.025$. La aplicación práctica de los límites de confianza se demuestra en las págs. 416- 418.

Ejemplo 2. Calcular los intervalos de confianza al 95% para la media de una muestra pequeña.



Calcular el intervalo de confianza al 95% para el valor medio de la actividad de lactato-deshidrogenasa (LD) de un material de control estable después de llevar a cabo 15 determinaciones diarias.

Muestra: Todos los valores de LD están en UI/L: 324, 337, 350, 295, 284, 322, 339, 350, 309, 322, 348, 320, 298, 345, 335.

La media y desviación estándar calculadas de la muestra son 325 y 21 UI/L, respectivamente.

El error estándar de la media (EEM) se calcula:

$$s_{\bar{x}} = s / \sqrt{N} = 21 / \sqrt{15} = 5.42 \text{ IU/L}$$

Utilizando la tabla de t en la Tabla 19-1, se encuentra el valor de t de dos colas para $p = 0.05$ y $N - 1$ grados de libertad ($gl = 14$). El valor de t de 2.14 es el factor que se utiliza para ajustar el EEM de tal forma que se puedan determinar los límites inferior y superior del intervalo de confianza al 95% para la media de esta pequeña muestra. Utilizando la ecuación 19-5:

$$\mu = \bar{x} \pm t \cdot s_{\bar{x}}$$

Límite inferior del intervalo de confianza: $325 - (2.14)(5.42) = 313.4 \text{ UI/L}$

Límite superior del intervalo de confianza: $325 + (2.14)(5.42) = 336.6 \text{ UI/L}$

Existe una probabilidad del 95% de que la actividad media de la LD en esta muestra de mediciones de control de calidad se encuentre entre 313.4 y 336.6 UI/L.

Medidas de exactitud y precisión

En secciones anteriores se describió la media y la desviación estándar de una población de distribución normal. Cuando se evalúa un nuevo método analítico en el laboratorio, estos parámetros se utilizan para describir la exactitud y precisión del método (ver Capítulo 22). *Exactitud* describe la capacidad de un método analítico de obtener el resultado “verdadero” o correcto a partir de un número de análisis replicados. Mientras más cerca se encuentre la media de N análisis replicados de una muestra del valor “verdadero” o conocido de esa muestra, más exacto será el método. *Precisión* describe la reproducibilidad de un método. Mientras más estrecha sea la distribución de resultados, esto es, mientras menor sea la desviación estándar obtenida a partir de un número de análisis replicados, mejor es la precisión de un método.

La Fig. 19-7 muestra los resultados de análisis replicados de la misma muestra por tres métodos diferentes. Todos los métodos tienen una media similar y por lo tanto similar exactitud. Sin embargo, las distribuciones o desviaciones estándar de los resultados de cada método son diferentes. El método A tiene la distribución más estrecha o desviación estándar más pequeña y por lo tanto tiene la mejor precisión de los tres. El método C tiene la distribución más amplia o la mayor desviación estándar y la menor precisión.

En la Fig. 19-8 se presentan los resultados de análisis replicados de la misma muestra por dos métodos diferentes. Ambos métodos tienen una distribución similar de los datos o desviaciones estándar similares, por lo tanto su precisión es casi la misma. Las medias, sin embargo, no son iguales y las exactitudes relativas no son las mismas, lo que indica un sesgo no aleatorio entre los métodos. El método con mayor exactitud será aquel cuya media se encuentre más cercana al valor “verdadero” del compuesto examinado en la muestra.

Aunque los términos se usan a veces de manera indistinta, exactitud y precisión son



dos conceptos diferentes y nunca deben ser confundidos. Esto se muestra en la Fig. 19-9. Los puntos indican intentos repetidos de atinar en el centro del blanco, el valor verdadero. Un método puede ser exacto pero no preciso, como se muestra en la Fig. 19-9, A. Inexactitud pero buena precisión se muestran en la Fig. 19-9, B, donde los valores caen cercanos unos a otros, pero se encuentran alejados del valor central o “verdadero”. La Fig. 19-9, C muestra el objetivo de todos los buenos métodos analíticos: excelente exactitud y precisión.

Comparaciones Paramétricas de Poblaciones

Hipótesis nula y significación estadística

Cuando se hace una comparación entre dos muestras provenientes de dos poblaciones, se observa invariablemente una diferencia entre las medias (\bar{x}) y entre las desviaciones estándar (s). Esas diferencias observadas pueden o no reflejar una diferencia verdadera entre las poblaciones. Por lo tanto, es necesario probar la *hipótesis nula*, que afirma que no hay diferencia entre las medias verdaderas (μ) o las desviaciones estándar verdaderas (σ) de las dos poblaciones. Los valores calculados correspondientes, \bar{x} o s , se utilizan para este propósito.

Dos hipótesis

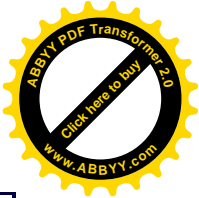
$$\begin{array}{ll} s_1^2 = s_2^2 & \text{o} \quad \bar{x}_1 = \bar{x}_2 & \text{Hipótesis nula} \\ s_1^2 \neq s_2^2 & \text{o} \quad \bar{x}_1 \neq \bar{x}_2 & \text{Hipótesis alternativa} \end{array}$$

Existen numerosas pruebas estadísticas que se pueden utilizar para generar un *estadístico* que indique si se debe aceptar o rechazar la hipótesis nula. Si el resultado de la prueba estadística indica que la hipótesis nula debe ser aceptada, hay una probabilidad de que el estadístico calculado que forma la base de los resultados de la prueba no refleje la verdad y que la hipótesis nula se acepte incorrectamente. El nivel de significación o probabilidad de que esto ocurra está definido por el valor p , donde 100% ($1 - p$) es el porcentaje de confianza de que los resultados de la prueba sean estadísticamente significativos. Normalmente se usa un valor mínimo de $p = 0.05$ para probar la significación. Esto significaría que hay una probabilidad del 95% de que los resultados de una prueba estadística sean significativos, o de manera alternativa hay una probabilidad del 5% de aceptar el resultado de la prueba estadística cuando éste es incorrecto.

Para muchas aplicaciones en química clínica, solamente una diferencia que sea diferente estadísticamente puede ser aceptable para aplicaciones de rutina. Por supuesto que es importante identificar diferencias que *son* de significación médica o que no cumplen con requisitos reguladores (ver Capítulos 21 y 22).

Grados de libertad.

El término *grados de libertad* se define a menudo como el número de formas en que un grupo de números puede variar independientemente. Esta idea es con frecuencia difícil de explicar o definir. Se calcula restando el número de parámetros estimados del tamaño de muestra. Por ejemplo, considere 20 mediciones de bilirrubina; el tamaño de muestra es 20 y para esta serie el número de grados de libertad es 20. Se puede alterar cualquiera de esos 20 valores, y el



cambio no afecta el valor de ninguna de las otras mediciones en la serie. Sin embargo, si se calcula la media de 20 valores, la media tiene solo 19 o $n - 1$ grados de libertad. Es posible cambiar 19 valores sin alterar la media, pero el vigésimo valor necesita ser un número específico para que la media siga siendo la misma. Por lo tanto, para el cálculo de la media, los grados de libertad se calculan como $n - 1$. El número de grados de libertad es un parámetro importante que se usa en el cálculo de muchas pruebas estadísticas, como la prueba de t .

Comparación de la variación aleatoria (precisión): la prueba de F

La prueba de t se usa con frecuencia para comparar las medias (\bar{x}) de dos grupos de observaciones a fin de probar si existe una diferencia estadísticamente significativa entre las dos medias grupales (ver pág. 353). Las dos suposiciones que se hacen con la prueba de t son: que los grupos se encuentran *normalmente* distribuidos y que no hay una diferencia estadísticamente significativa entre las varianzas de los grupos. No es posible saber sólo por observación de los datos que tan diferentes pueden ser las varianzas de dos grupos antes de usar la prueba de t . Sin embargo, la hipótesis nula de que no hay una diferencia significativa entre las varianzas se puede probar utilizando la *prueba de F* .

La *prueba de F* o *prueba de razón de varianzas* se utiliza para determinar si una diferencia observada entre las desviaciones estándar (s) de dos grupos de datos es estadísticamente significativa. El estadístico F se calcula dividiendo la varianza mayor (s_1^2) entre la varianza menor (s_2^2), como se muestra en la ecuación 19-6:

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2}$$

Ec. 19-6

El valor calculado de F se compara con un valor crítico F que se obtiene de una tabla de F (Tabla 19-2) utilizando el número de grados de libertad de cada grupo a un nivel específico de p tal como $p = 0.05$. Si el valor calculado de F es menor que el valor crítico, se acepta la hipótesis nula como verdadera. Si el valor calculado de F es mayor que el valor crítico, la hipótesis alternativa se acepta como verdadera.

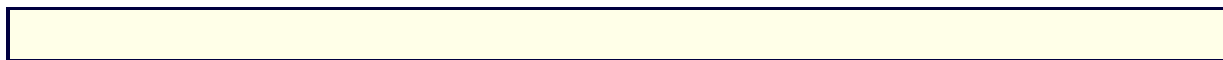
Ejemplo 3. Prueba de F

Se necesita una comparación entre los niveles de folato de dos grupos, pero las desviaciones estándar parecen considerablemente diferentes. A continuación se muestran los niveles de folato de 21 empleados de laboratorio y 16 individuos con sospecha de anemia dietética.

Folato sérico ($\mu\text{g/L}$)

Empleados ($n = 21$)

Pacientes ($n = 16$)



	13	5
	18	15
	14	2
	16	21
	19	6
	15	7
	12	16
	17	4
	13	3
	16	5
	15	18
	17	2
	18	6
	20	1
	17	4
	13	16
	21	
	15	
	16	
	19	
	16	
<hr/>		
Promedio	16.2	8.2
Desviación estándar	2.44	6.59

$$F = \frac{(6.59)^2}{(2.44)^2} = \frac{43.43}{5.95} = 7.30$$

Use la tabla de F (Tabla 19-2) para encontrar un valor crítico de F . Recorra la tabla hasta encontrar la columna que corresponda a $n - 1$ grados de libertad en el numerador (15) y siga hacia abajo hasta la hilera que corresponda a $n - 1$ grados de libertad en el denominador (20) y advierta un valor crítico de 2.20. Puesto que el valor calculado excede este número, la diferencia en precisión es significativa con $p < 0.05$.

Los resultados de esta prueba indican que la prueba de t *no* debe usarse para comparar las dos medias. La prueba de Mann y Whitney puede ser una mejor alternativa y se discute más adelante en este capítulo.

Comparación de medias (exactitud o sesgo): prueba de t

La prueba de t se utiliza para verificar la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre dos medias experimentales o entre una media experimental y un valor establecido.

Prueba de hipótesis.

Probar si existe una diferencia entre una media experimental y un valor establecido o conocido implica realizar una prueba para determinar si este valor se encuentra incluido en el intervalo de confianza que rodea a la media experimental. Si no lo está, se rechaza la hipótesis nula, y aparentemente existe una diferencia entre el valor establecido y el valor medio experimental. En este caso, las ecuaciones 19-7 y 19-8 se utilizan para calcular la estadística t



apareada, que se usa para determinar si la hipótesis nula será aceptada o rechazada.

$$t = \frac{\text{Media muestral} - \text{Media hipotética}}{\text{Error estándar muestral}} \quad \text{Ec. 19-7}$$

$$t = \frac{\bar{x} - \mu}{s / \sqrt{n}} \quad \text{Ec. 19-8}$$

Por ejemplo, asuma que se indica que la concentración de glucosa en un espécimen de control de calidad que se obtuvo del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología es de 1120 mg/L. Este material se utiliza como una muestra de control de calidad por 30 días consecutivos.

Para estos datos, la media es 1110 mg/L y la s_d es 25 mg/L. ¿Es la media de los datos significativamente diferente del valor establecido?

$$t = \frac{1110 - 1120}{\frac{25}{\sqrt{30}}} = -2.19$$

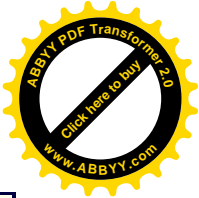
El valor crítico de t para una $p = 0.05$ y 29 gl (redondeado a 30 en la Tabla 19-1) es 2.04. Además, la media de este mes de 1110 mg/L es significativamente diferente de la concentración indicada de glucosa de 1120 mg/L. Ver también en la pág. 413 para una aplicación de la prueba de t a fin de evaluar el sesgo en un experimento de comparación de métodos.

La prueba de significación estadística entre dos medias utilizando la prueba de t , en realidad implica probar el grado de superposición de sus respectivas distribuciones de probabilidad. Si la superposición es escasa o no existente, se considera que las poblaciones son diferentes. Si hay una superposición significativa, no es posible asegurar que haya una diferencia. Se calcula un valor de t a partir de los datos y se compara con un valor crítico de t . La Tabla 19-1 proporciona muchos de los valores críticos de la distribución de t . Si el valor absoluto del valor calculado de t no excede el valor crítico de t , se acepta la hipótesis nula, lo que indica que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las dos distribuciones, esto es, que las medias son iguales.

Cuando se comparan las medias de diferentes poblaciones muestrales, existen dos pruebas de t disponibles, la *prueba de t no apareada* y la *prueba de t apareada*.

Prueba de t no apareada.

La prueba de t no apareada se utiliza para analizar la diferencia entre las medias de dos poblaciones independientes. Un ejemplo es la comparación de las medias de valores de glucosa de pacientes de dos hospitales diferentes. Cuando se utiliza la prueba de t no apareada, se asume que las varianzas de dos poblaciones son iguales, y esto debe verificarse primero mediante la prueba de F . Si no hay una diferencia estadísticamente significativa entre las varianzas, entonces es apropiado proceder con la prueba de t . La *varianza* global de la



muestra(s_p^2) se calcula primero como se muestra en la ecuación 19-9:

$$s_p^2 = \frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2} \quad \text{Ec. 19-9}$$

donde s_1 y s_2 son las desviaciones estándar de los dos grupos de tamaños n_1 y n_2 . Utilizando \bar{x}_1 y \bar{x}_2 para las medias de los dos grupos, la *prueba de t no apareada* se calcula como se muestra en la ecuación 19-10:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s_p \sqrt{1/n_1 + 1/n_2}} \quad \text{Ec. 19-10}$$

donde s_p es la desviación global de la muestra. Cada grupo contribuye a los grados de libertad asociados con s_p , por lo que la estadística t no apareada tiene $(n_1 - 1) + (n_2 - 1)$ o $n_1 + n_2 - 2$ grados de libertad. El valor crítico de t se encuentra en una tabla de t utilizando los grados de libertad calculados y comparados con el valor calculado de t .

Ejemplo 4. Prueba de t no apareada con igual varianza

Un laboratorio de referencia empieza a utilizar un nuevo método de inmunoglobulina A sérica. Las muestras se reciben de dos regiones del país. Muestras aleatorias de pacientes sanos de cada región se prueban para averiguar si el intervalo de referencia para ambas regiones es el mismo.

	Región A	Región B
Media (\bar{x}) (mg/L)	2260	2650
Desviación estándar (s) (mg/L)	584	473
Número de muestras (n)	33	29

La prueba de t no apareada se utiliza para determinar si las diferencias observadas entre las dos medias son significativas. La prueba de F se lleva a cabo primero para asegurarse que las varianzas son estadísticamente iguales.

$$F = \frac{(584)^2}{(473)^2} = \frac{341056}{223729} = 1.52$$

Utilice la tabla de F (Tabla 19-2) para encontrar el valor crítico de F . Recorra la tabla hasta encontrar la columna que corresponda a $n - 1$ grados de libertad en el numerador (32) y siga hacia abajo hasta la hilera que corresponda a $n - 1$ grados de libertad en el denominador (28) y advierta un valor crítico de 1.84. (Se puede interpolar la tabla para obtener el valor exacto para $n_1 = 32$ y $n_2 = 28$, o se puede redondear a 30, como se muestra en este ejemplo.) Puesto que el valor calculado es menor que el valor crítico, la diferencia en precisión no es significativa para $p < 0.05$. El resultado de esta prueba indica que la prueba de t puede ser utilizada para comparar dos valores medios.

Para obtener la t , primero debe calcularse s_p .



$$s_p^2 = \frac{(33-1)(584)^2 + (29-1)(473)^2}{33+29-2}$$

$$s_p^2 = 286303$$

$$s_p = \sqrt{286303} = 535$$

El estadístico t se calcula entonces:

$$t = \frac{2260 - 2650}{535\sqrt{1/33 + 1/29}} = -2.86$$

Utilice la tabla de t (Tabla 19-1) para encontrar el valor crítico de t . Recorra la tabla hasta encontrar la columna que corresponda a $n_A + n_B - 2$, o 60 grados de libertad y observe un valor crítico de 2.00. Puesto que el valor absoluto del valor calculado de t , $|-2.86| = 2.86$ y éste es mayor que 2.00, la diferencia entre medias es significativa para $p < 0.05$. Por lo tanto, las distribuciones muestrales para ambas regiones no se traslapan lo suficiente para declararlas iguales. El laboratorio necesitaría diferentes intervalos de referencia regionales para las muestras que está analizando.

Suponga que $s_1 \neq s_2$, pero se tiene una certeza razonable de que las dos poblaciones se siguen una distribución normal. En este caso, el estimador global de la varianza s_p^2 no puede utilizarse. Sin embargo, puede usarse otra forma de prueba de t no apareada, denominada *prueba de la t varianzas independientes*. La fórmula en la ecuación 19-11 se aproxima a una distribución t de Student para variables que siguen una distribución normal y no requiere que las varianzas poblacionales sean iguales.

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{(s_1^2/n_1 + s_2^2/n_2)^{1/2}} \quad \text{Ec. 19-11}$$

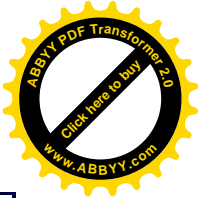
El número de grados de libertad puede encontrarse utilizando la fórmula que se muestra en la ecuación 19-12. La respuesta se redondea hacia el siguiente valor entero menor. Por ejemplo, 7.6 son 7 grados de libertad.

$$df = \frac{(w_1 + w_2)^2}{w_1^2/(n_1 - 1) + w_2^2/(n_2 - 1)} \quad \text{Ec. 19-12}$$

donde df = grados de libertad y $w_1 = s_1^2/n_1$ y $w_2 = s_2^2/n_2$.

Ejemplo 5. Prueba de t no apareada para varianzas diferentes

En un estudio de hepatitis crónica, se midieron los niveles de fosfatasa alcalina sérica de 9 pacientes con la enfermedad no activa y 25 pacientes con la enfermedad activa. Utilice la prueba de t no apareada para



probar la hipótesis de que existe una diferencia en las medias de fosfatasa alcalina entre las poblaciones con la enfermedad activa y no activa.

Fosfatasa alcalina sérica (UI/L)		
	Inactiva	Activa
	65	103
	72	210
	84	92
	68	225
	89	110
	110	286
	77	96
	95	216
	81	94
		150
		195
		208
		95
		163
		184
		89
		238
		99
		116
		224
		124
		135
		201
		92
		176
\bar{x}	82	157
s	14.2	58.5
n	9	25

El estadístico F para las varianzas muestrales es $(58.5)^2/(14.2)^2 = 16.74$, que es mucho mayor que el valor crítico de 3.12 (Tabla 19-2). Puesto que no se puede asumir que las varianzas sean iguales, se utiliza la prueba de t para varianzas diferentes.

$$t = \frac{82_1 - 157}{[(14.2)^2 / 9 + (58.5)^2 / 25]^{1/2}}$$

$$t = -75/12.6 = -5.95$$

Los grados de libertad son:

$$w_1 = (14.2)^2 / 9 = 22.4$$



$$w_2 = (58.5)^2 / 25 = 136.9$$

$$df = \frac{(w_1 + w_2)^2}{w_1^2/(n_1 - 1) + w_2^2/(n_2 - 1)} \quad \text{Ec. 19-12}$$

$$df = \frac{(22.4 - 136.9)^2}{(22.4)^2/(9 - 1) + (136.9)^2/(25 - 1)^{1/2}}$$

$$df = 25376/843 = 30.1 \cong 30$$

La Tabla 19-1, para 30 grados de libertad da un valor crítico de t para $p=0.05$ de 2.4.

Puesto que el valor absoluto calculado de t $|-5.95| = 5.95$, es mayor que 2.04, la diferencia entre las medias es significativa con $p < 0.05$. Por lo tanto, podemos asumir que los dos grupos de enfermos provienen de dos poblaciones diferentes.

Prueba de t apareada.

La prueba de t de muestra apareada es un caso especial de comparación de medias. La prueba de muestra apareada (también llamada prueba de muestra “dividida”) se utiliza para minimizar los efectos de la variabilidad entre muestras, que pueden llevar a obtener resultados erróneos. Por ejemplo, si el método x de presión parcial de oxígeno (PO_2) en sangre fuera comparado con el método y de PO_2 y las muestras fueran obtenidas de diferentes poblaciones aleatorias de pacientes para cada método, las verdaderas diferencias metodológicas podrían estar enmascaradas por variaciones intrínsecas entre las poblaciones. Para eliminar sesgo, se analizan los mismos especímenes por ambos métodos (ver Ejemplo 6). La fórmula que se utiliza para calcular el estadístico t apareado se muestra en la ecuación 19-13:

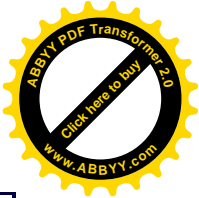
$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s_d / \sqrt{n}} \quad \text{Ec. 19-13}$$

donde \bar{x}_1 y \bar{x}_2 son las medias de dos poblaciones apareadas, s_d es la desviación estándar de la diferencia entre las poblaciones, y n es el número de muestras. Hay $n - 1$ grados de libertad. s_d se calcula con la desviación estándar de las diferencias entre cada par de resultados o entre cada resultado y un valor conocido o establecido. El ejemplo 6 muestra el cálculo de una prueba de t apareada entre dos grupos de datos.

Ejemplo 6. Prueba de t apareada

Un laboratorio examina un nuevo método de PO_2 examinando 40 muestras de forma apareada utilizando un instrumento viejo y uno nuevo. Utilizando una prueba de t apareada, compare los datos para determinar si existe sesgo entre los métodos.

PO_2 (mm Hg)



	Viejo	Nuevo	Diferencia
	88	88	0
	118	121	-3
	115	119	-4
	189	198	-9
	36	36	0
	123	123	0
	123	118	5
	200	203	-3
	60	62	-2
	86	86	0
	61	62	-1
	81	87	-6
	33	31	2
	223	232	-9
	47	48	-1
	38	36	2
	140	142	-2
	67	67	0
	87	90	-3
	218	225	-7
	79	80	-1
	56	56	0
	228	224	4
	65	67	-2
	86	88	-2
	327	334	-7
	59	62	-3
	36	36	0
	100	101	-1
	146	140	6
	112	106	6
	218	212	6
	95	94	1
	67	68	-1
	71	72	-1
	102	100	2
	92	91	1
	106	105	1
	64	60	4
	105	114	-9
Prom.	108.7	109.6	-0.93
s	64.1	65.3	3.86

Primero debe verificarse la igualdad entre varianzas mediante el uso de la prueba de F para determinar que no existe una diferencia significativa entre ellas. El estadístico F para las varianzas muestrales es: $(65.3)^2/(64.1)^2 = 1.04$, que es menor que el valor crítico de F de 1.69 (Tabla 19-2) para $p = 0.05$ y 39 grados de libertad. Puesto que las varianzas no son significativamente diferentes, se puede utilizar la prueba de t .

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s / \sqrt{n}}$$

$$t = \frac{-0.93_2}{3.86 / \sqrt{40}}$$

$$t = -1.52$$

El valor crítico de t para $p = 0.05$ y 39 grados de libertad es 2.02. Puesto que el valor absoluto calculado de t $|-1.52| = 1.52$, que según la Tabla 19-1 es menor que el valor crítico, 2.02, la diferencia entre las medias no es estadísticamente significativa. Los resultados proporcionados por los dos métodos analíticos no difieren estadísticamente uno de otro.

Análisis de varianza unidireccional (ANOVA)

El ANOVA es un método para probar la hipótesis de que varios grupos diferentes (tres o más), cuyas distribuciones son normales, tienen todos la misma media. Una forma lógica de resolver este problema puede ser llevar a cabo una prueba de t para cada diferencia, empezando con la mayor hasta que la hipótesis nula sea rechazada en alguna prueba. Por ejemplo, si se comparan tres medias poblacionales probando la hipótesis de que todas las medias poblacionales son iguales, sería necesario llevar a cabo tres pruebas de t : una prueba para la hipótesis $\bar{x}_1 = \bar{x}_2$, una prueba para la hipótesis $\bar{x}_1 = \bar{x}_3$ y una prueba para la hipótesis $\bar{x}_2 = \bar{x}_3$. Sin embargo, esta forma de abordar el problema se haría más compleja, y por tanto más ineficaz según fuera aumentando el número de poblaciones. Además, cuando se llevan a cabo muchas comparaciones, alguna de ellas fallará por pura probabilidad.

En ANOVA, k medias (donde $k \geq 3$) se comparan probando la hipótesis nula de que: $\bar{x}_1 = \bar{x}_2 = \bar{x}_3 = \dots = \bar{x}_k$. Se calcula un estadístico F , y si éste es menor que un valor especificado, entonces se acepta la hipótesis nula de que las medias de todos los grupos no son significativamente diferentes unas de otras. La hipótesis alternativa siempre es que al menos una media de una de las muestras no es igual a las otras. Si la hipótesis nula se rechaza, no se puede afirmar que todas las medias son diferentes. Solo se puede concluir que una de las medias muestrales no es igual a alguna de las otras. Puesto que el ANOVA no permite decir cual de las medias es significativamente diferente de las otras, se utilizan otros métodos como el de Bonferroni para comparaciones múltiples, [ref\(329\)](#) para determinar cual de las medias es diferente.

Una gran ventaja del ANOVA comparado con el uso de pruebas de t individuales es que utiliza la mayor la población de muestra. Al utilizar todos los datos posibles, el ANOVA calcula en esencia el mejor estimador de la verdadera varianza poblacional. Entonces, las diferencias entre las medias poblacionales se prueban con referencia a este mejor estimador de la varianza poblacional. Esto disminuye la posibilidad de que diferencias aleatorias en las varianzas dentro de los grupos individuales oscurezcan los hallazgos verdaderos. En el laboratorio de química clínica, el ANOVA puede ser una herramienta estadística útil.

Identificación de valores atípicos en una muestra utilizando la prueba de diferencias (Ver

también pág. 371)

Cuando los resultados o datos puntuales se distribuyen gaussiana siguiendo una distribución normal, el dibujar una gráfica de frecuencia de los datos permite evaluarlos visualmente. Es posible que durante esta evaluación el investigador identifique un *valor atípico*, que es un resultado o valor puntual que se encuentra tan alejado de la escala de los otros valores que no se considera probable que ese resultado provenga de la población origen de la muestra. Desafortunadamente, aunque un investigador con experiencia pueda confiar en esta evaluación, una inspección visual de una distribución de frecuencia o histograma es subjetiva por naturaleza.

Ciertas muestras se pueden evaluar para determinar la presencia de valores alejados utilizando un criterio más riguroso establecido por el investigador, por ejemplo, la exclusión de valores puntuales que exceden un cierto porcentaje de la media o la mediana. La *prueba de diferencias*^{ref(330)} es una técnica estadística que permite al investigador estudiar una muestra detectar valores alejados.

El uso de la prueba de diferencias proporciona evidencia estadística válida que justifica la exclusión de un valor atípico de una muestra particular. A fin de utilizar la prueba de diferencias en una muestra, se debe ordenar una serie de resultados, desde el menor valor hasta el mayor. A los resultados se les asigna entonces valores particulares de x en cualquiera de las siguientes formas:

$$\begin{aligned} x_1 < x_2 < \dots < x_n & \text{ cuando se prueba un valor extremo elevado} \\ x_n < x_{n-1} < \dots < x_1 & \text{ cuando se prueba un valor extremo bajo} \end{aligned}$$

En el primer caso, el valor más pequeño se designa como x_1 ; mientras que en el segundo el valor más grande es x_1 . Se selecciona entonces cocientes particulares de la prueba a partir de tablas estadísticas estándar, comparando diferentes valores de n y niveles de significación variables.^{ref(331)} Un cociente de la prueba de muestra es la razón de dos ecuaciones diferentes que describe la relación de x con el rango total de valores. Una vez que se calcula el cociente de la prueba, es posible determinar si existe una “diferencia” no aceptable estadísticamente entre este x y el resto de los datos. Si es así, uno puede descartar justificadamente el valor x de un grupo de datos como un valor alejado. Puesto que existen diferentes niveles de significación y valores diferentes de n , hay diferentes cocientes de la prueba que se pueden utilizar. Los textos que proporcionan esas tablas indican qué cociente de la prueba de muestra se debe utilizar para cada el valor de n , el nivel de significación seleccionado, y el valor (en el extremo superior o inferior) que se va a probar. Las pruebas de un valor extremo elevado requieren el uso de una tabla diferente de la que se utiliza para la prueba de valores extremos bajos.

El uso del cociente de prueba la permite el cálculo de una diferencia utilizando valores puntuales específicos en la lista ordenada. Como ejemplo, el cociente de prueba de muestra utilizado para n igual a 15 cuando se prueba un valor extremadamente alto requeriría el cálculo de una distancia basada en los resultados ordenados designados como:

$$\frac{x_n - x_{n-2}}{x_n - x_3}$$

La diferencia recomendada se calcula en base a n de la muestra y se compara con el valor enlistado en la tabla estadística en la columna de significación elegida (por ejemplo, $p < 0.05$). Si la diferencia calculada es mayor que el valor de la tabla (a la probabilidad deseada y para el valor dado de n), el puede descartar justificadamente este valor como un valor alejado con el límite de significación seleccionado en la tabla.

Comparaciones no Paramétricas de Poblaciones

Estadísticas de distribución no paramétricas

Las pruebas estadísticas descritas anteriormente se denominan estadísticas paramétricas puesto que se realiza a partir de los datos de una distribución gaussiana o normal. Muchas poblaciones no cumplen con este criterio, y el analista requiere de técnicas para describir y comparar estas poblaciones estadísticamente. Las estadísticas no paramétricas no requieren suposiciones sobre la distribución y por lo tanto pueden considerarse más generales que las estadísticas paramétricas.

El procedimiento no paramétrico más simple es colocar los valores en orden desde el menor (valor = 1) hasta el mayor (valor = n). La amplitud del conjunto de valores es la diferencia entre el valor y el mayor, y la mediana indica la tendencia central del conjunto de datos. Los datos ordenados pueden utilizarse, por ejemplo, para determinar los límites de los intervalos de referencia para aquellos resultados analíticos cuyas distribuciones no son gaussianas. Generalmente se selecciona el percentil inferior 2.5 y el percentil superior 97.5 de los datos ordenados como los límites inferior y superior de un intervalo de referencia. El 95% de los valores centrales se encuentran dentro de los límites del intervalo de referencia (ver pág.348).

Prueba del signo

Una de las pruebas no paramétricas más simples para comparar dos poblaciones no normales es la *prueba del signo*. Esta prueba es análoga a la prueba de t . En esencia, esta prueba utiliza la mediana de un conjunto de valores en vez de la media. En una de sus aplicaciones, todos los valores de un solo conjunto de datos pueden compararse con un valor establecido (crítico). A los valores puntuales mayores que el valor establecido se les asigna un signo positivo (+), a los valores menores se les asigna un signo negativo (-), y se asignan ceros a aquellos valores iguales al valor crítico. La prueba del signo también puede utilizarse para comparar los resultados de dos métodos (A y B) utilizando muestras apareadas. Si el valor de B es mayor que A para una muestra dada, a la muestra se le asigna un valor positivo. Si el valor de B es menor que A, entonces se le asigna un valor negativo, y se asignan ceros a aquellas muestras en que $A = B$. Se asume la hipótesis de que no hay diferencia entre la mediana del conjunto de valores de la muestra y el valor crítico o entre las dos muestras para cada par de valores, dependiendo de como se utiliza la prueba. Si esta hipótesis es correcta, la diferencia mediana ($A - B$) debe ser cero y debe haber aproximadamente el mismo número de diferencias negativas y positivas.

La prueba se lleva a cabo designando la diferencia entre cada par de datos como negativa, positiva o cero, sin importar la diferencia numérica real, y a continuación tabulando los resultados. Se compara entonces el número de resultados negativos con un intervalo



crítico en una tabla de límites de confianza “exactos” para N_p (Tabla 19-3), buscando en la tabla a partir del número de diferencias distintas de cero observadas entre las dos poblaciones. N_p es una forma corta de designar el tamaño de muestra, N , y el nivel de significación de la probabilidad, p . Por lo tanto, se puede asegurar que la Tabla 19-3 describe límites de confianza exactos para un tamaño de muestra dado y para una probabilidad determinada. Si el valor de la diferencia negativa (el número de resultados negativos) se encuentra por fuera del valor crítico, la diferencia entre las medianas de las dos poblaciones se considera significativa. El uso de la prueba del signo se demuestra en el Ejemplo 7.

Ejemplo 7. Prueba del signo

A fin de determinar si existe una diferencia significativa entre las concentraciones de potasio en suero y plasma (mmol/L), se han obtenido ambos tipos de muestras de 18 voluntarios.

Plasma	Suero	Diferencia
4.0	4.2	-
3.8	3.8	0
3.6	3.7	-
3.9	3.8	+
4.4	4.5	-
4.6	4.4	+
4.8	4.9	-
4.5	4.7	-
4.3	4.5	-
4.0	3.9	+
4.1	4.1	0
4.0	4.1	-
3.5	3.6	-
3.7	3.7	0
3.6	3.7	-
4.2	4.2	0
4.1	4.0	+
4.5	4.5	0

La hipótesis nula asume que no existe diferencia entre las medianas de dos muestras. Si esta hipótesis es correcta, la diferencia entre la mediana de las muestras de plasma y la mediana de las muestras de suero debe ser cero. Debe haber un número de diferencias negativas y positivas aproximadamente igual.

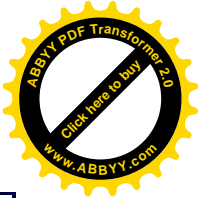
Negativas 9

Positivas 4

Ceros 5

El número de diferencias negativas se lleva a una tabla de límites de confianza “exactos” para N_p . Busque en la tabla $N =$ (número total de pares de datos) - (número total de diferencias igual a cero) (ver Tabla 19-3).

$$N = 18 - 5 = 13$$



El intervalo crítico para un tamaño de muestra ajustado de 13 es 2 - 11. Puesto que el número observado de diferencias negativas, 9, no cae fuera de este intervalo, la diferencia entre las medianas entre las muestras apareadas de plasma y suero no es significativamente diferente de cero al nivel de 5%.

Prueba de suma de rangos de Mann y Whitney (ver Ejemplo 8)

Otra alternativa a la prueba de t es la *prueba de suma de rangos*. Existen dos variantes de esta prueba, una propuesta por Wilcoxon, y la otra por Mann y Whitney. La prueba se conoce como prueba de Mann y Whitney para evitar confundirla con la prueba apareada que también fue desarrollada por Wilcoxon.

Para llevar a cabo la prueba, se ordenan los valores de las dos poblaciones que se van a comparar como si pertenecieran a una única población, y se calcula entonces la suma de los rangos (números de orden) de cada grupo. El valor de la suma más bajo se designa T y se utiliza en la tabla de *regiones de aceptación para la suma de rangos T* (Tabla 19-4); el valor de la suma mayor se designa en la tabla como N_2 . Si el *valor T* se encuentra fuera del intervalo de aceptación para el número de valores en cada muestra, la diferencia en las medianas de dos poblaciones se considera significativa a un valor elegido de p .

Si las poblaciones fueran idénticas, se esperaría una distribución uniforme entre los rangos de las dos muestras. Cuando las poblaciones son iguales, no debe observarse una suma de rangos muy grande ni muy pequeña. La tabla de suma de rangos proporciona los límites de esos extremos, y si éstos se exceden, entonces tiene sentido rechazar la hipótesis nula de igualdad entre dos poblaciones.

Ejemplo 8. La prueba de suma de rangos de Mann y Whitney

Se ha realizado un estudio para determinar si existe alguna diferencia entre las concentraciones de nitrógeno ureico en sangre (BUN) en receptores de transplantes renales con función de injerto estable y un grupo de pacientes con infecciones del tracto urinario (UTI). Se obtuvieron los siguientes resultados, en miligramos por litro:

UTI ($n_1 = 14$)		Transplante ($n_2 = 12$)	
Rango	BUN	Rango	BUN
1	150		
2	170		
3	180		
*4.5	190		
*4.5	190		
**7	200		
**7	200		
		**7	200
9.5	210		
		9.5	210
12	220		
		12	220
		12	220
14	230		
16.5	240		
16.5	240		



		16.5	240
		16.5	240
		19	250
20.5	260		
		20.5	260
		22	270
23	280		
24	290		
		25	310
		26	320
Suma = 160.5		Suma =	190.5

La suma menor ($T = 160.5$) se lleva a una tabla de intervalos de aceptación para la suma de rangos T (Tabla 19-4) para un nivel de $p = 0.05$, y para $n_1 = 14$, $n_2 = 12$. El intervalo de aceptación es 150 a 228. La T calculada cae dentro de este intervalo, y, por tanto, la diferencia en las medianas de BUN entre ambas poblaciones no se considera significativa al nivel de 5%.

$$*4.5 = \frac{4+5}{2}$$

$$**7 = \frac{6+7+8}{3}$$

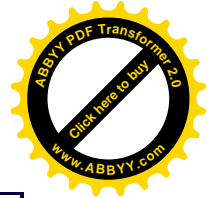
Análisis de χ^2 (Chi-cuadrado)

Cuando queremos hacer un análisis estadístico de variables numéricas (cuantitativas continuas), podemos utilizar el análisis de regresión y los coeficientes de correlación. Para variables discretas, aquellas que solo toman determinados valores, como si/no o positivo/negativo, se utiliza el *análisis de Chi-cuadrado* para probar si las poblaciones están relacionadas. El análisis se basa en la diferencia entre la frecuencia observada y la frecuencia esperada de los valores en una población.

Co frecuencia, los resultados obtenidos con muestras verdaderas no coinciden exactamente con los resultados teóricos que se esperan de acuerdo con las reglas de probabilidad. Por ejemplo, si una moneda no troncada se lanza al aire 100 veces, el resultado esperado serían 50 caras y 50 cruces. Sin embargo, estos resultados exactos solo se obtienen en raras ocasiones. Se necesitaría un método estadístico para determinar si las frecuencias observadas, por ejemplo 47 caras y 53 cruces, difieren significativamente de las frecuencias esperadas (50 caras y 50 cruces). El método estadístico de χ^2 proporciona una medida de la discrepancia aleatoria que puede existir entre las frecuencias observadas y esperadas de los resultados de un análisis. La fórmula para el cálculo de χ^2 se muestra en la ecuación 19-14:

$$\chi^2 = \frac{(o_1 - e_1)^2}{e_1} + \frac{(o_2 - e_2)^2}{e_2} + \dots + \frac{(o_k - e_k)^2}{e_k} \quad \text{Ec. 19-14}$$

donde o = frecuencia observada y e = frecuencia esperada. Si $\chi^2 = 0$, las frecuencias



observada y esperada coinciden, mientras que si $\chi^2 > 0$, no coinciden exactamente. Cuanto mayor es el valor de la χ^2 , mayor es la discrepancia entre las frecuencias observada y esperada.

El análisis de Chi-cuadrado se usa con mucha frecuencia en la investigación médica para resolver cuestiones como la relación entre sexo, edad, raza o estado hormonal, y algún resultado de laboratorio o condición física de un paciente (tal como diabetes o hipertensión).

Ejemplo 9. χ^2 (análisis de ji-cuadrada Chi-cuadrado)

En un estudio diseñado para determinar si existe una diferencia significativa en la respuesta positiva a un receptor de estrógeno en tumores de mama extirpados de mujeres pre y postmenopáusicas, se observó la siguiente frecuencia de resultados positivos:

Mujeres premenopáusicas:	RE+	308/581
Mujeres postmenopáusicas:	RE+	648/1079

¿Es significativa la diferencia observada en la respuesta positiva al receptor de estrógeno (RE) entre ambos grupos?

	Pos	Neg	Total
Valores observados			
<i>Pre</i>	308	273	581
<i>Post</i>	648	431	1079
<i>Total</i>	956	704	1660
Valores esperados			
<i>Pre</i>	335	246	581
<i>Post</i>	621	458	1079
<i>Total</i>	956	704	1660

$$\chi^2 = \frac{(308 - 335)^2}{335} + \frac{(648 - 621)^2}{621} + \frac{(273 - 246)^2}{246} + \frac{(431 - 458)^2}{458}$$
$$\chi^2 = 7.9$$

El valor crítico de $\chi^2_{0.05}$ para 1 grado de libertad es 3.84 (ver Tabla 19-5). Puesto que $7.90 > 3.84$, se rechaza la hipótesis de que no hay diferencia entre los grupos y se acepta, por tanto, la hipótesis de que hay una tasa de positividad del receptor de estrógeno que es significativamente mayor en tumores de mama extirpados de mujeres postmenopáusicas.

Cuando se hace una comparación entre una muestra y otra, como en en este ejemplo del receptor de estrógeno, una regla fácil para calcular los grados de libertad es que son igual a:

$$(\text{Número columnas} - 1) \times (\text{Número filas} - 1)$$

Ejemplo: $(\text{Pos} + \text{Neg} - 1) \times (\text{Pre} + \text{Post} - 1) = 1$

Ejemplo 10. Continuación de χ^2 (análisis de Chi-cuadrado)

Los números representados en la tabla de Chi-cuadrado expresan los valores de la variable del ejemplo anterior. Los valores esperados se calculan suponiendo que la distribución porcentual entre los valores negativos y positivos debe ser igual tanto para la población premenopáusica como para la postmenopáusica. Esto es cierto para cualquier tabla 2×2 de Chi-cuadrado.

	Pos	Neg	Total
Observado			
<i>Pre</i>	a_1	a_2	N_a
<i>Post</i>	b_1	b_2	N_b
<i>Total</i>	N_1	N_2	N_T
Esperado			
<i>Pre</i>	$N_1(N_a/N_T)$	$N_2(N_a/N_T)$	N_a
<i>Post</i>	$N_1(N_b/N_T)$	$N_2(N_b/N_T)$	N_b
<i>Total</i>	N_1	N_2	N_T

Existen fórmulas sencillas para calcular χ^2 que utilizan solo las frecuencias observadas. A continuación se dan los resultados para la tabla de contingencia 2×2 utilizada en el ejemplo del receptor de estrógeno presentado anteriormente.

$$\chi^2 = \frac{N(a_1b_2 - a_2b_1)^2}{(a_1 + b_1)(a_2 + b_2)(a_1 + a_2)(b_1 + b_2)} = \frac{N\Delta^2}{N_1N_2N_aN_b}$$

$$\chi^2 = \frac{1660(132,748 - 176,904)^2}{956 \times 704 \times 581 \times 1079} = 7.67$$

Regresión Lineal y Correlación

Para un gran número de aplicaciones de laboratorio clínico resulta útil determinar la relación entre dos variables, x y y . Si consideramos la variable x como una variable “fija” o independiente, y la variable y como una variable “no fija” o dependiente, entonces podemos definir matemáticamente a y como una *función* de x . Un procedimiento estadístico ampliamente utilizado y en ocasiones mal empleado para evaluar esta relación, o describir esta función, es el análisis de regresión.

El análisis de regresión “lineal” simple puede utilizarse cuando la relación entre la variable independiente x y la variable dependiente y es una relación lineal. Este tipo de análisis de regresión se denomina “simple” porque solo existe una variable independiente. El modelo más simple para una relación entre dos variables es una línea recta. El análisis de regresión lineal se puede representar en un eje de coordenadas x,y , donde cada par de valores es un punto en la gráfica. Una vez que se sitúan todos los pares x,y , se puede trazar manualmente la

línea recta que mejor se ajusta a los puntos de la gráfica. Si la línea recta dibujada sugiere una representación válida de la relación entre x y y , la línea se denomina *recta de regresión*, y su cálculo se denomina “regresión de y sobre x ”.

El análisis de regresión lineal simple se utiliza para responder a la pregunta: Si conocemos el valor de una variable (x), ¿podemos calcular el valor de la otra variable (y) bajo ciertas condiciones? Existe otra forma de hacer esta pregunta. ¿Pueden usarse los cambios en x para predecir los cambios en y ? En función de esto, la variable x también puede denominarse “predictora” y la variable y puede ser denominada variable “respuesta”.

En regresión lineal simple, la ecuación que describe la relación lineal entre x y y también se puede decir que describe y como una función de x , esto es, $y = f(x)$. Esta función se describe en la ecuación 19-15:

$$y = \alpha + \beta x + \varepsilon \quad \text{Ec. 19-15}$$

donde α es el valor verdadero de la constante de la recta de regresión y β es el valor verdadero de la pendiente de la recta de regresión. Utilizando esta función, puede usarse la variable x para hacer una predicción de la variable y .

En la práctica, los valores de α y β en la ecuación 19-15 se desconocen y deben ser estimados como a y b , respectivamente. Es de esperar también que la mayor parte de los valores puntuales no caigan precisamente en la recta de regresión. El término se incluye en la ecuación 19-15 para describir la distancia entre cualquier valor observado de y y el valor correspondiente de y que podría predecirse o esperarse para y , y que se expresa como y [gorro]. Este valor de ε también se denomina *residual* y representa la variabilidad que podemos esperar de y para cualquier valor conocido de x . Esta suposición básica para utilizar el análisis de regresión simple nos dice que para cualquier valor conocido de x , le corresponde una distribución normal de valores de y . Esta suposición se ilustra gráficamente en la Fig. 19-10, A. Nótese que la recta de regresión pasa a través de las medias de las distribuciones.

El uso del modelo de regresión lineal simple de manera apropiada requiere que las variables x y y , cumplan ciertas condiciones.

1. Los valores de x se consideran fijos, y cualquier error aleatorio en la medición de x puede ser considerado “insignificante”.
2. Para cada valor de x , existe una distribución normal de valores de y , como se ilustra en la Fig. 19-10, A.
3. La distribución de valores de y para cada valor de x tiene la misma varianza, esto es, la varianza alrededor de la línea es independiente del valor de x .
4. Los valores esperados de y para cada x generalmente se ajustan al modelo de línea recta.
5. La recta estimada no es horizontal (lo que quiere decir que, β no es igual a 0). Si la línea recta fuera horizontal, el valor estimado de y en la recta de regresión no sería un mejor predictor del verdadero valor de y (barra) que su media.

Si estas condiciones se cumplen, el uso del modelo de regresión lineal simple permitirá inferir correctamente los valores esperados de y para cada valor fijo de x .

Las condiciones mencionadas para la regresión lineal simple son válidas para la mayoría de las aplicaciones del laboratorio clínico. Pero en ciertos casos, los valores de x no se pueden considerar “fijos” o “invariables” como se definen en la condición 1. El uso incorrecto más común del análisis de regresión lineal simple implica la falsa suposición de que los valores de x son fijos y que x es una variable independiente, cuando en realidad no lo es. Por ejemplo, en una comparación típica de dos métodos, los resultados de un método uno de ellos se consideran como la variable independiente “ x ” (ver pág. 415). Aunque ese pueda ser el método utilizado, de referencia, los resultados de “ x ” no se pueden considerarse fijos, ya que conllevan cierto error de medición. En este caso, se podría considerar usar un tipo diferente de análisis de regresión. Aunque hay varios tipos de métodos de regresión descritas en la literatura, el más apropiada para cuando hay variabilidad en los valores de x y en los valores de y es la técnica de *regresión de Deming* (Fig. 19-10, B). [ref\(332\)](#)

En un análisis de regresión lineal simple, es posible determinar los valores de a y b haciendo un ajuste manual de los valores y la recta de regresión con el “mejor ajuste” (ver pág. 360). Sin embargo, el método utilizado habitualmente para calcular los parámetros de regresión correctos es el *método de mínimos cuadrados*. Utilizando este método, la suma de los cuadrados de los residuales de todos los valores y se minimiza matemáticamente. La predicción de los valores esperados y en base a los valores puntuales verdaderos x , y utilizando este método y el cálculo de la regresión estadística subsiguientes, ya sea por el modelo simple o el de Deming, se hace fácilmente con el uso de una calculadora o de un programa de ordenador de manera automática.

El método de mínimos cuadrados es válido si los residuales son aleatorios (esto es, independientes de los valores de x y y) y tienen una distribución normal con una media de 0 y una desviación estándar $S_{y,x}$. [ref\(333\)](#) La desviación estándar de los residuales, o *error estándar del estimador*, debe ser constante para cada valor de x (ver pág. 362). También se conoce que dentro del intervalo de medición en el que habitualmente se encuentra en la mayor parte de las aplicaciones del laboratorio clínico, el método de mínimos cuadrados también calcula correctamente una línea de regresión cuando $S_{y,x}$ es proporcional a x . [ref\(334\)](#)

Las aplicaciones de laboratorio clínico en las que se puede utilizar el análisis de regresión lineal simple, son las siguientes:

1. Comparación de resultados de un nuevo procedimiento, con los resultados de un procedimiento consolidado.
2. Comparación de una técnica con un método de referencia (ver ambas aplicaciones en el capítulo 22).
3. Comparación de resultados apareados de la misma prueba o analito obtenidos a partir de dos sistemas analíticos diferentes de uso vigente. Esta aplicación puede ser utilizada para validar sistemas de prueba con respecto a un sistema de prueba que ya ha sido validado previamente por un ensayo de aptitud externo. Esta aplicación cumple las correcciones al reglamento de ensayos de aptitud de 1988 para la Mejora del Laboratorio Clínico ("Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988 regulations for proficiency testing")



4. Comparación de los resultados de un mismo sistema analítico obtenidos en dos series analíticas diferentes.

Tanto en el análisis de regresión lineal simple como en el de Deming, existe una relación entre las variables x y y , aunque la descripción matemática de esta relación es diferente para cada tipo de técnica de regresión. Cuando existe una relación lineal entre dos variables, se considera que existe *correlación* entre ellas. Si los valores crecientes de x se relacionan de manera lineal con valores crecientes de y , entonces existe una *correlación positiva* entre estas variables. Si los valores crecientes de x se relacionan de manera lineal con valores decrecientes de y , hay una *correlación negativa* entre ambas variables (ver pág. 362).

Es posible desde luego que la relación entre dos variables sea no lineal. En este caso, el cálculo de los parámetros de regresión lineal básicos puede reflejar esta relación. Por ejemplo, la determinación del coeficiente de correlación r , puede dar un valor mucho más cercano a 0 que 1 o -1. También es posible que una relación no lineal sea reflejada en un valor creciente de $s_{y,x}$. En este caso, la aplicación de la regresión lineal simple o de la regresión de Deming no es apropiada y debe utilizarse otras técnicas de regresión. [refs\(335\)](#) Y por supuesto, una relación no lineal o un incremento de la dispersión pueden ser aparentes al inspeccionar visualmente la gráfica de regresión.

Estadísticas básicas de regresión lineal simple y correlación

Con los dos métodos de regresión lineal descritos anteriormente, la línea del mejor ajuste se determina por el método de mínimos cuadrados o por el método de Deming. En cualquier caso, una vez que se identifica la recta correcta que ajusta el modelo apropiado, esta recta se define mediante la ecuación 19-16:

$$y = bx + a \quad \text{Ec. 19-16}$$

donde b es la pendiente estimada de la línea de regresión y a es el estimador de la constante de la recta de regresión, que es la intersección entre la recta y el eje y .

Aunque la recta de regresión dibujada visualmente a partir de la nube de puntos parece el mejor estimador, este método no es recomendable. Es más apropiado hacer el cálculo de los parámetros de regresión a y b mediante una calculadora o un programa de ordenador, lo que permite la predicción exacta de cualquier valor adicional de y una vez conocido el valor de x . El cálculo automático de los parámetros de regresión y la determinación de dos valores de y , a partir de dos valores diferentes de x permite la colocación gráfica correcta de la línea de regresión, puesto que dos puntos definen una línea recta.

En regresión lineal simple, los parámetros estadísticos a y b , la constante y la pendiente de la recta de regresión, respectivamente, se pueden calcular mediante el uso de las ecuaciones 19-17 y 19-18:

$$a = \bar{y} - b\bar{x} \quad \text{Ec. 19-17}$$

$$b = \frac{\Sigma(x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\Sigma(x - \bar{x})^2} \quad \text{Ec. 19-18}$$

Para medir la variabilidad de los valores puntuales alrededor de la recta de regresión, es necesario determinar la desviación estándar de las diferencias entre los valores de y observados y predichos por la recta de regresión (esto es, los residuales). Esta variabilidad, denominada *error estándar del estimador*, se calcula utilizando la ecuación 19-19:

$$S_{y,x} = \left(\frac{\sum (y - \bar{y})^2}{N - 2} \right)^{1/2} \quad \text{Ec. 19-19}$$

Se utilizan de $(N - 2)$ grados de libertad en el denominador debido a que deben determinarse dos coeficientes de regresión a partir de los datos, (a y b), para calcular los valores de y . Es decir, se imponen dos restricciones en las N observaciones.

La variabilidad de la pendiente estimada de la recta de regresión simple, b , se determina calculando primero su desviación estándar, s_b , mediante la ecuación 19-20:

$$s_b = s_{y,x} / [\sum (x_i - \bar{x})^2]^{1/2} \quad \text{Ec. 19-20}$$

y a continuación se determina el intervalo de confianza del $100(1 - p)\%$ para la pendiente verdadera, β , usando la ecuación 19-21:

$$\beta = b \pm t \cdot s_b \quad \text{Ec. 19-21}$$

donde obtenemos el valor de t a partir de una tabla de t bilateral para $N - 2$ grados de libertad y el nivel significación deseado.

La variabilidad de la constante estimada de la recta de regresión lineal simple, a , se calcula de manera similar. La desviación estándar estimada de a , s_a , se calcula utilizando la ecuación 19-22:

$$S_a = S_{y,x} [\sum x_i^2 / N \sum (x_i - \bar{x})^2]^{1/2} \quad \text{Ec. 19-22}$$

y determinando el intervalo de confianza del $100(1 - p)\%$ para la constante verdadero, α , mediante la ecuación 19-23:

$$\alpha = a \pm t \cdot s_a \quad \text{Ec. 19-23}$$

donde t se obtiene, nuevamente, de una tabla de t bilateral para $N - 2$ grados de libertad y el nivel de significación deseado.

El estadístico que proporciona una medida de la diferencia que existe entre los puntos y la recta de regresión es r , o coeficiente de correlación de Pearson. Este coeficiente de correlación, r , es una medida de asociación lineal entre las dos variables. El cálculo de r se ilustra en la ecuación 19-24:

$$r = \frac{\sum(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\{[\sum(x_i - \bar{x})^2][\sum(y_i - \bar{y})^2]\}^{1/2}} \quad \text{Ec. 19-24}$$

En esencia, r describe la fuerza de la correlación entre las variables x y y .

El coeficiente de correlación, r , toma valores desde -1 a 1 . Si r es igual a 1 , existe una correlación positiva perfecta entre las variables. Si r es igual a -1 , hay una correlación negativa perfecta entre las variables. Cuanto más alejado se encuentre el coeficiente de correlación de 0 , más fuerte es la correlación, positiva o negativa, entre las variables. Si el coeficiente de correlación es igual a 0 , no existe relación *lineal* entre las variables. Esto no debe interpretarse como la no existencia de una relación entre las dos variables. Es posible que estas variables no correlacionadas stengan una relación no lineal importante (esto podría comprobarse mediante inspección visual del diagrama de puntos x, y).

¿Para que valor de r es posible asumir que no existe una relación lineal entre las variables x y y ? Desde un punto de vista empírico, un valor de r entre -0.7 y 0.7 indicaría que la relación entre x e y puede ser lineal con una probabilidad menor del 50%. Conforme r se aproxima a cero, esta probabilidad también se acerca a cero. Si los valores recogidos para un análisis por regresión lineal provienen de métodos de rutina de laboratorio, una consideración práctica sería que un valor bajo de r puede ser causado por una precisión muy pobre del método utilizado para obtener los valores de x , los valores de y , o ambos.

En el ejemplo 11 se presenta una demostración del uso de las ecuaciones 19-17 a 19-24 para el cálculo de las estadísticas básicas del análisis de regresión lineal simple. Este ejemplo ilustra el uso del análisis de regresión lineal simple y del análisis de regresión de Deming para la comparación de dos métodos para la determinación de potasio. Las ecuaciones para el cálculo de las estadísticas de regresión de Deming se presentan en otra parte. [ref\(336\)](#)

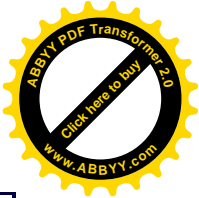
Ejemplo 11. Análisis de regresión lineal

En un estudio inicial de comparación de métodos, se obtienen 42 pares de mediciones de potasio a partir de un método consolidado (viejo) y un método experimental (nuevo). Calcule los estadísticos de regresión, asumiendo primero que la variabilidad del método viejo es insignificante (utilizando análisis de regresión lineal simple) y después asumiendo que existe variabilidad en el método consolidado (utilizando las ecuaciones de regresión de Deming, [ref\(337\)](#)).

Assumiendo que la variabilidad en el método consolidado es insignificante, calcule el error estándar del estimador, la variabilidad de la pendiente y constante estimados, y los intervalos de confianza del 95% para la pendiente y la constante poblacional verdaderos.

Todos los resultados de potasio x, y (viejo, nuevo) se encuentran en milimoles por litro:

3.9, 3.9	3.9, 3.9	3.4, 3.4	5.4, 5.2	4.0, 4.0
4.6, 4.5	4.2, 4.2	4.3, 4.1	4.3, 4.3	4.8, 4.7
3.7, 3.6	4.4, 4.3	4.4, 4.4	4.5, 4.4	3.9, 3.9
4.3, 4.3	3.8, 3.7	3.8, 3.7	3.9, 3.8	4.0, 3.9
4.6, 4.5	3.4, 3.4	4.2, 4.1	3.8, 3.8	3.6, 3.6
4.3, 4.3	4.1, 4.0	3.5, 3.4	4.6, 4.8	4.1, 4.2
3.7, 3.1	4.1, 4.1	4.8, 4.7	3.3, 3.2	5.4, 5.4
4.0, 3.9	4.5, 4.4	3.5, 3.6	3.7, 3.7	4.1, 4.1



3.6, 3.5

3.0, 3.1

	Análisis de regresión lineal simple	Regresión de Deming
Pendiente (b)	0.99	0.98
Constante (a)	-0.03	0.22
$S_{y,x}$	0.12	0.09
r	0.97	0.98

Para los intervalos de confianza del 95% y $N - 2$ grados de libertad (40), el valor de t a partir de una tabla bilateral es = 2.021.

Variabilidad de la pendiente estimada:

Desviación estándar de la pendiente estimada (b) =

$$s_b = s_x / [E (x_i - \bar{x})^2]^{1/2} = 0.12/3.24 = 0.04$$

Intervalo de confianza para la pendiente verdadera (β) =

$$\beta = b \pm t \cdot s_b = 0.99 \pm 2.021 (0.04) = 0.99 \pm 0.07$$

Variabilidad de la constante estimada:

Desviación estándar de la constante estimada (a) =

$$s_a = s_{y,x} [E x_i^2 / NE (x_i - \bar{x})^2]^{1/2} = 0.12(1.28) = 0.15$$

Intervalo de confianza para la constante verdadera (α) =

$$\alpha = a \pm t \cdot s_a = 0.03 \pm 2.021 (0.15) = -0.03 \pm 0.30$$

Prueba para valores alejados utilizando análisis residual

El análisis de regresión lineal simple puede ser utilizado para identificar valores alejados, o valores apareados extremos, en los valores puntuales x, y . Este procedimiento implica la construcción de gráficas de residuales, o, contra la variable independiente x . [ref\(338\)](#) Así podemos considerar excluir cualquier valor que genera residuales mayores de $4 s_{y,x}$. La gráfica de residuales puede ser valorada contra la variable independiente x para evaluar la igualdad de varianzas. Si las varianzas son iguales, los residuales representados aparecerán como una banda horizontal de puntos que son independientes de x (una de las condiciones necesarias para aplicar la regresión lineal simple a un par de variables).

Es posible obtener información adicional construyendo la gráfica de los residuales contra los valores predichos de y . Si existe una relación lineal verdadera entre las variables x y y , los residuales estarán dispersados aleatoriamente, de manera horizontal, alrededor del cero.



Limitaciones del análisis de regresión lineal simple

Cuando se analizan datos apareados que oscilan en un intervalo limitado por el método de regresión lineal simple, un nivel aceptable de error aleatorio puede aún dar como resultado estimadores inexactos de la pendiente y constante de la recta de regresión. Este problema se acrecienta cuando la variable x no es una variable fija o independiente. En esta situación, el cálculo del error estándar de la pendiente y la variable de la recta están muy alterados, por lo que debemos utilizar el análisis de regresión de Deming en lugar del análisis de regresión lineal simple.

Existen otras situaciones en las que se recomienda utilizar la regresión de Deming en lugar del análisis de regresión lineal simple. Se puede hacer una evaluación inicial representando una variable en el eje x en una gráfica x,y inicial y calculando los estadísticos de regresión. Se repite entonces el procedimiento con la segunda variable representada en el eje x . Si las dos rectas de regresión de mínimos cuadrados son diferentes una de la otra, debe utilizarse la regresión de Deming. El método de Deming generará una recta de regresión entre x e y que toma en cuenta el error en la medición de ambas variables. Una característica de la técnica de regresión de Deming es que al intercambiar las variables y calcular nuevamente los estadísticos de regresión se obtienen resultados idénticos a las obtenidas en el cálculo inicial.

Finalmente, debe hacerse notar que el valor de r en un análisis de regresión lineal simple es sensible tanto a la dispersión de los valores puntuales como al intervalo de esos valores. La dispersión de los valores puntuales es una característica del método dependiente que está siendo evaluado. Pero es posible incrementar el valor de r al aumentar simplemente el intervalo de valores. La extensión de este intervalo por un solo punto más allá de la mayoría de los valores puntuales, donde este solo punto parece demostrar una estrecha concordancia entre x y y , incrementará substancialmente el valor de r . Esta característica se describe en la ecuación 19-25:

$$r = (1/s_x) (s_x^2 + s_{y,x}^2)^{1/2} \quad \text{Ec. 19-25}$$

donde s_x es la desviación estándar de la población x , un indicador de la dispersión de los valores x . Conforme s_x se incrementa en relación con $s_{y,x}$, r se acerca a 1. Debido a esta característica, se aconseja siempre evaluar una gráfica x,y , examinando visualmente la recta de regresión lineal simple generada a partir de los datos. Puede resultar obvio que un punto que queda más allá o por debajo de la recta de regresión sea un valor alejado. Sin embargo, un valor alejado más insidioso es aquel punto que se encuentra exactamente en la línea de regresión pero que se encuentra a una distancia considerable del intervalo del resto de los valores puntuales utilizados para generar los estadísticos de regresión.

Referencias

1. Barnett RN: *Clinical laboratory statistics*, ed 2, Boston, 1979, Little, Brown & Co.
2. Lenter C: *Geigy scientific tables, vol 2, Introduction to statistics, statistical tables, mathematical formulae*, ed 8, Allschwil, Switzerland, 1982, Ciba-Geigy.
3. Spiegel MR: *Schaum's outline series theory and problems of statistics*, ed 2, New York, 1988, McGraw-Hill.



4. Mason RL, Gunst RF, Hess JL: *Statistical design y analysis of experiments with applications to engineering y science*, New York, 1989, Wiley & Sons.
5. Snedecor GW, Cochran WG: *Statistical methods*, ed 8, Ames, Iowa, 1989, Iowa State University Press.
6. Shott S: *Statistics for health professionals*, Philadelphia, 1990, Saunders.
7. Altman DG: *Practical statistics for medical research*, New York, 1991, Chapman & Hall.
8. Dowdy S, Wearden S: *Statistics for research*, ed 2, New York, 1991, Wiley & Sons.
9. Lenter C: *Geigy scientific tables, vol 2, Introduction to statistics, statistical tables, mathematical formulae*, ed 8, Allschwil, Switzerland, 1982, Ciba-Geigy. Significance limits for testing extreme values of a sample, p. 60.
10. Wallers PJM, Hellendoorn HBA, Op de Weegh GJ, Heerspink W: Applications of statistics in clinical chemistry —a critical evaluation of regression lines, *Clin Chim Acta* 64:173-184, 1975.
11. Cornbleet PJ, Gochman N: Incorrect least-squares regression coefficients in method- comparison analysis, *Clin Chem* 25(3):432-438, 1979.

Tablas

Tabla 19-1. Valores críticos de t para probabilidades seleccionadas, p , y grados de libertad, gl .

bilaterales		Intervalos o pruebas	
		$p = 0.10$	$p = 0.05$
$p = 0.01$			
unilaterales		Límites o pruebas	
		$p = 0.05$	$p = 0.025$
gl $p = 0.005$			
63.70	1	6.31	12.70
	2	2.92	4.30
9.92	3	2.35	3.18
5.84	4	2.13	2.78
4.60	5	2.01	2.57
4.30	6	1.94	2.45
3.71	7	1.89	2.36
3.50	8	1.86	2.31
3.36	9	1.83	2.26



3.25			
	10	1.81	2.23
3.17	12	1.78	2.18
3.05	14	1.76	2.14
2.98	16	1.75	2.12
2.92	18	1.73	2.10
2.88	20	1.72	2.09
2.85	30	1.70	2.04
2.75	40	1.68	2.02
2.70	60	1.67	2.00
2.66	120	1.66	1.98
2.62	∞	1.64	1.96
2.58			
Condensada de: Davies OL, Goldsmith PL: <i>Statistical methods in research y production</i> , ed 4, New York, 1972, Longman.			

Tabla 19-2. Valores críticos de F para $p = 0.05$ y grados de libertad seleccionados, gl .

gl para el denominador	<u>Grados de libertad para el numerador</u>						∞
	5	10	15	20	30	60	
1	230.00	242.00	246.00	248.00	250.00	252.00	
2	19.30	19.40	19.40	19.40	19.50	19.50	19.50
3	9.01	8.79	8.70	8.66	8.62	8.57	8.53
4	6.26	5.96	5.86	5.80	5.75	5.69	4.36
5	5.05	4.74	4.62	4.56	4.50	4.43	4.36
6	4.39	4.06	3.94	3.87	3.81	3.74	3.67
7	3.97	3.64	3.51	3.44	3.38	3.30	3.23
8	3.69	3.35	3.22	3.15	3.08	3.01	2.93
9	3.48	3.14	3.01	2.94	2.86	2.79	2.71
10	3.33	2.98	2.85	2.77	2.70	2.62	2.54
15	2.90	2.54	2.40	2.33	2.25	2.16	2.07
20	2.71	2.35	2.20	2.12	2.04	1.95	1.84
30	2.53	2.16	2.01	1.93	1.84	1.74	1.62
60	2.37	1.99	1.84	1.74	1.65	1.53	1.39



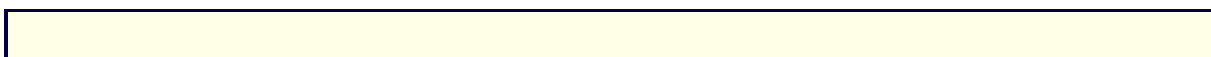
?	2.21	1.83	1.67	1.57	1.46	1.32	1.00
Modificada de: Barnett RN: <i>Clinical laboratory statistics</i> , ed 2, Boston, 1979, Little, Brown & Co.							

Tabla 19-3. Límites de confianza exactos para N_p (distribución binomial), $p = 0.05$; $N = 0$ a 99.

N	0	1	2	3	4	5	6	7	8
9									
0	—	—	—	—	—	—	0-6	0-7	0-8
1-9									
10	1-9	1-10	2-10	2-11	2-12	3-12	3-13	4-13	
4-14		4-15							
20	5-15	5-16	5-17	6-17	6-18	7-18	7-19	7-20	
8-20		8-12							
30	9-21	9-22	9-23	10-23	10-24	11-24	11-25	12-25	
12-26		12-27							
40	13-27	13-28	14-28	14-29	15-29	15-30	15-31	16-31	
16-32		17-32							
50	17-33	18-33	18-34	18-35	19-35	19-36	20-36	20-37	
21-37		21-38							
60	21-39	22-39	22-40	23-40	23-41	24-41	24-42	25-42	
25-43		25-44							
70	26-44	26-45	27-45	27-46	28-46	28-47	28-48	29-48	
29-49		30-49							
80	30-50	31-50	31-51	32-51	32-52	32-53	33-53	33-54	
34-54		34-55							
90	35-55	35-56	36-56	36-57	37-57	37-58	37-59	38-59	
38-60		39-60							
Condensada de: Lenter C: <i>Geigy scientific tables</i> , vol 2, <i>Introduction to statistics, statistical tables, mathematical formulae</i> , ed 8, Allschwil, Switzerland, 1982, Ciba-Geigy.									

Tabla 19-4. Región de aceptación para la suma de rangos T (prueba para 2 muestras de Mann y Whitney-Wilcoxon), $p = 0.05$.

N_1	1	2	3	4	5	6	7
N_2							
1	—	—	—	—	—	—	—
2	—	—	—	—	—	—	—



3	–	–	–	–	15-30	22-38	29-48
4	–	–	–	10-26	16-34	23-43	31-53
5	–	–	6-21	11-29	17-38	24-48	33-58
6	–	–	7-23	12-32	18-42	26-52	34-64
7	–	–	7-26	13-35	20-45	27-57	36-69
8	–	3-19	8-28	14-38	21-49	29-61	38-74
9	–	3-21	8-28	14-38	21-49	29-61	38-74
10	–	3-23	9-33	15-45	27-57	32-70	42-84
11	–	3-25	9-36	16-48	24-61	34-74	44-89
12	–	4-26	10-38	17-51	26-64	35-79	46-94
13	–	4-28	10-41	18-54	27-68	37-83	48-99
14	–	4-30	11-43	19-57	28-72	38-88	50-104
15	–	4-32	11-46	20-60	29-76	40-92	52-109

N_1	8	9	10	11	12	13	14
15							

N_2							
1	–	–	–	–	–	–	–
–							
2	38-58	45-63	55-75	66-88	79-101	92-116	
106-132	121-149						
3	38-48	47-70	58-82	69-96	82-110	95-126	
110-142	125-160						
4	40-64	49-77	60-90	72-104	85-119	99-135	
114-152	130-170						
5	42-70	52-83	63-97	75-112	89-127	103-144	
118-162	134-181						
6	44-76	55-89	64-104	79-119	92-136	107-153	
122-172	139-191						
7	46-82	57-96	69-111	82-127	96-144	111-162	
127-181	144-201						
8	49-87	60-10	72-118	85-135	100-152	115-171	
131-191	149-211						
9	51-93	62-109	75-125	89-142	104-160	119-180	
136-200	154-221						
10	53-99	65-115	78-132	92-150	107-169	124-188	
141-209	159-231						
11	55-105	68-121	81-139	96-157	111-177	128-197	
145-219	164-241						
12	58-110	71-127	84-146	99-165	115-185	132-206	
150-228	169-251						
13	60-116	73-134	88-152	103-172	119-193	136-215	
155-237	174-261						
14	62-122	76-140	91-159	106-180	123-201	141-223	
160-246	179-271						
15	65-127	79-146	94-166	110-187	127-209	145-232	
154-256	184-281						

Condensada de: Lenter C: *Geigy scientific tables*, vol 2,
*Introduction to statistics, statistical tables, mathematical
formulae*, ed 8, Allschwil, Switzerland, 1982, Ciba-Geigy.



Tabla 19-5. Valores críticos para Chi-cuadrado.

Nivel	0.10	0.05	0.01
gl			
1	2.706	3.841	
6.635			
2	4.605	5.991	
92.10			
3	6.251	7.815	
11.345			
4	7.779	9.488	
13.277			
5	9.236	11.070	
15.086			
6	10.654	12.592	
16.812			
7	12.017	14.067	
18.475			
8	13.362	15.507	
20.090			
9	14.684	16.919	
21.666			
10	15.987	18.387	
23.209			
Condensada de: Lenter C: <i>Geigy scientific tables</i> , vol 2, <i>Introduction to statistics, statistical tables, mathematical formulae</i> , ed 8, Allschwil, Switzerland, 1982, Ciba-Geigy			

Figuras

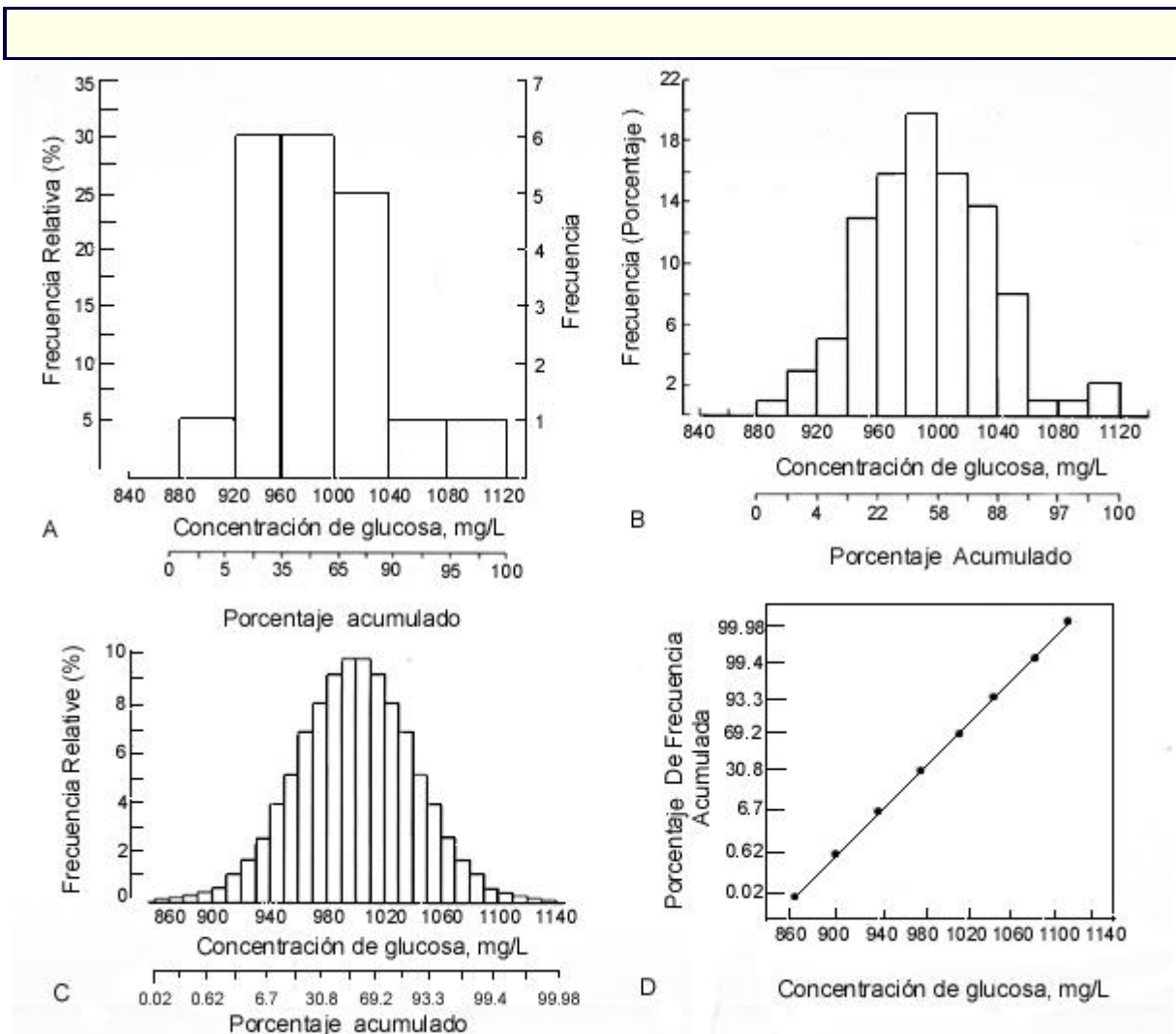


Figura. 19-1 A, Histograma (distribución de frecuencia) de los resultados de glucosa obtenidos a partir de 20 mediciones repetidas de la misma muestra utilizando una anchura de barra de 40 mg/L. B, Con $N = 100$ y anchura de barra = 20 mg/L. C, Con N infinito y anchura de barra = 10 mg/L. D, Gráfica de probabilidad normal de los resultados de glucosa obtenidos como se describe en C.

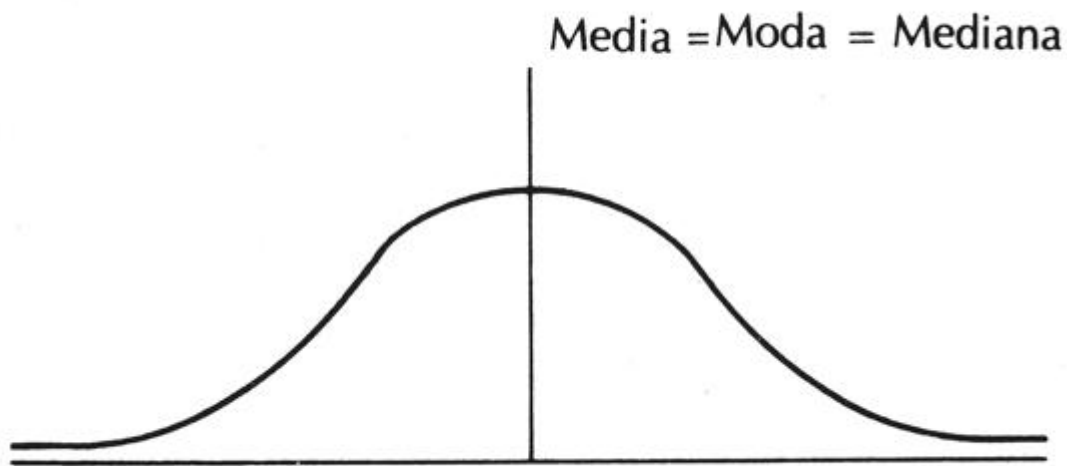
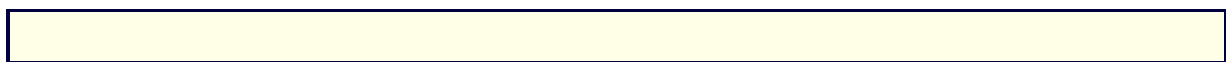


Figura 19-2 Distribución normal (gaussiana), simétrica alrededor de la media.

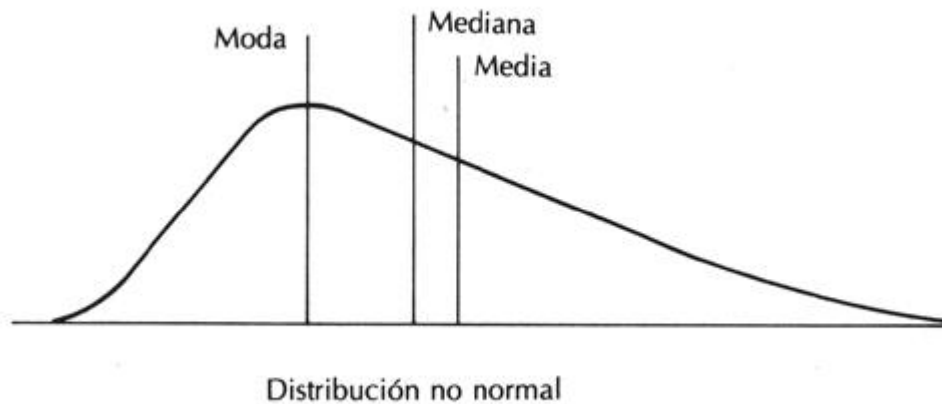


Figura 19-3. Distribución no normal.

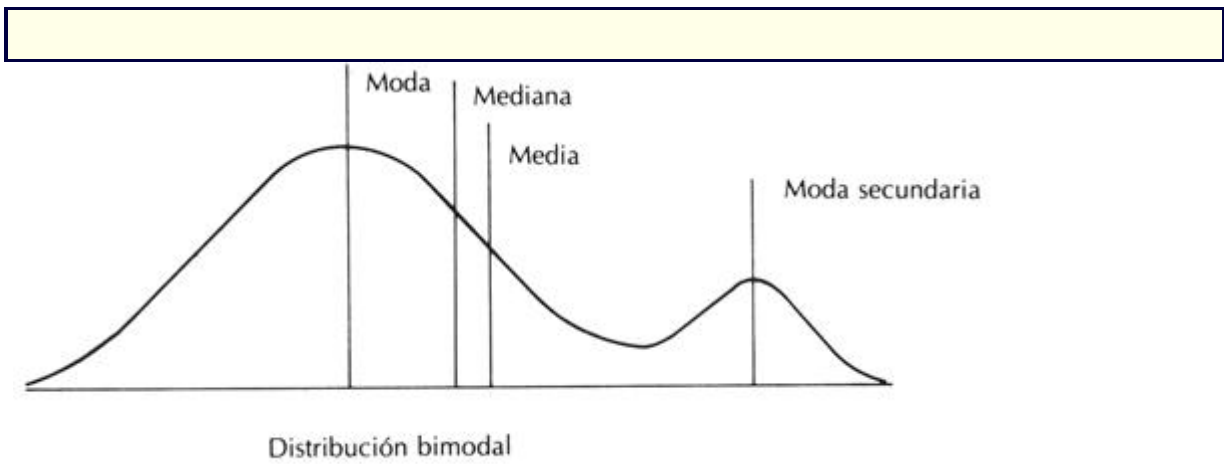


Figura 19-4 Distribución bimodal.

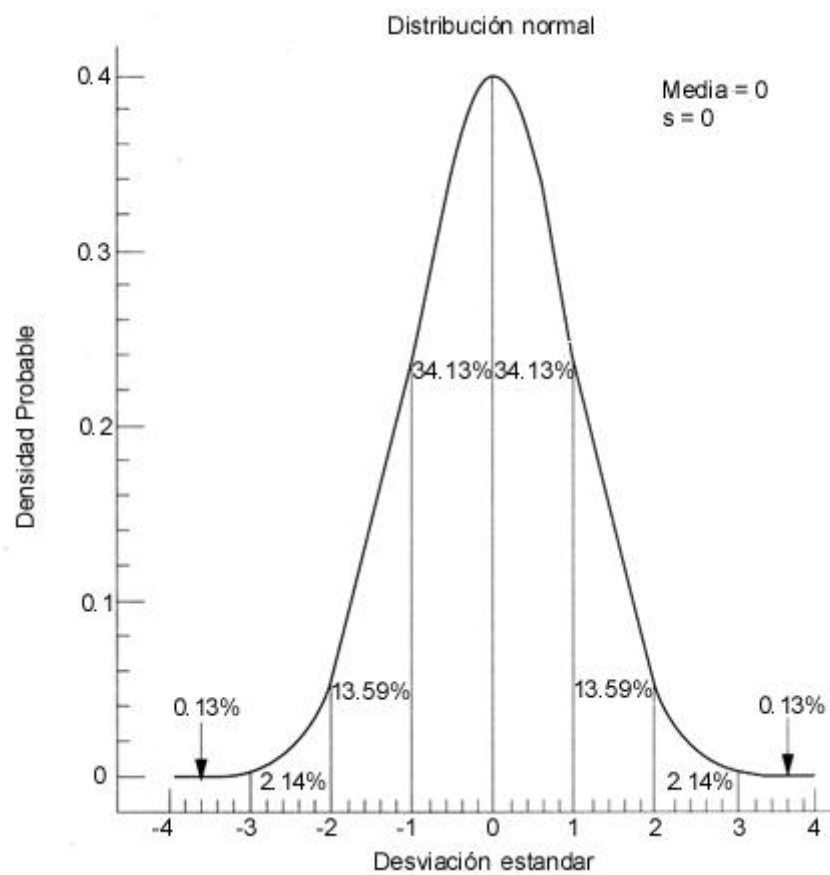
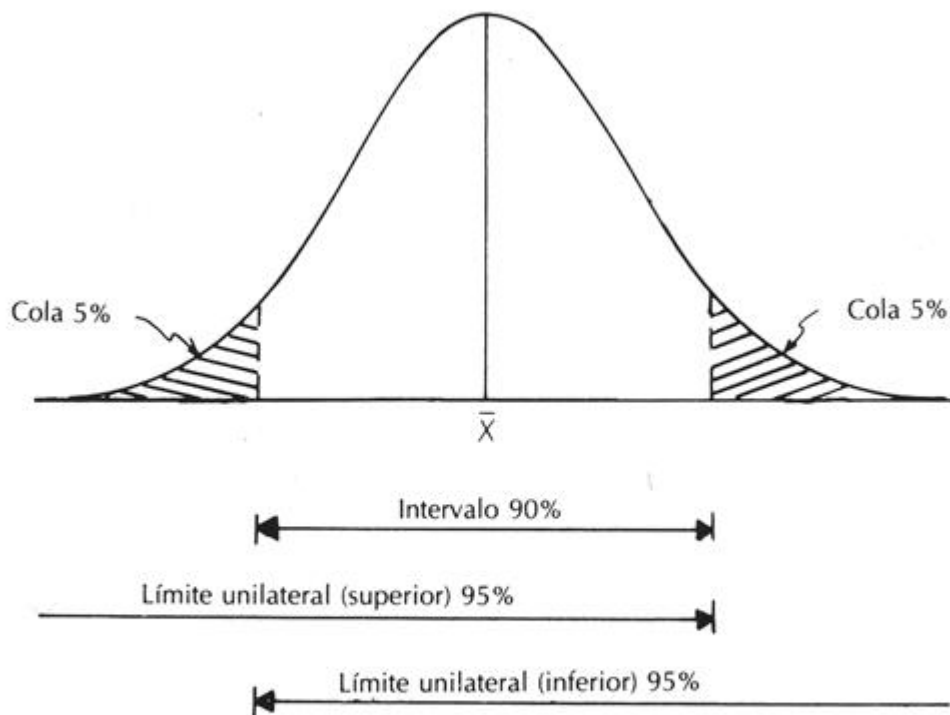


Figura 19-5 Distribución normal perfecta, con media = 0, indicando el porcentaje de los resultados que se encuentran en cada intervalo de la desviación estándar entre -4 y +4 desviaciones estándar.



Los valores de t para calcular el intervalo 90% y los límites unilaterales son los mismos.

Figura 19-6 Valores de t de unilateral y bilateral. Los valores de t para calcular el intervalo del 90% y los límites unilaterales del 95% son iguales.

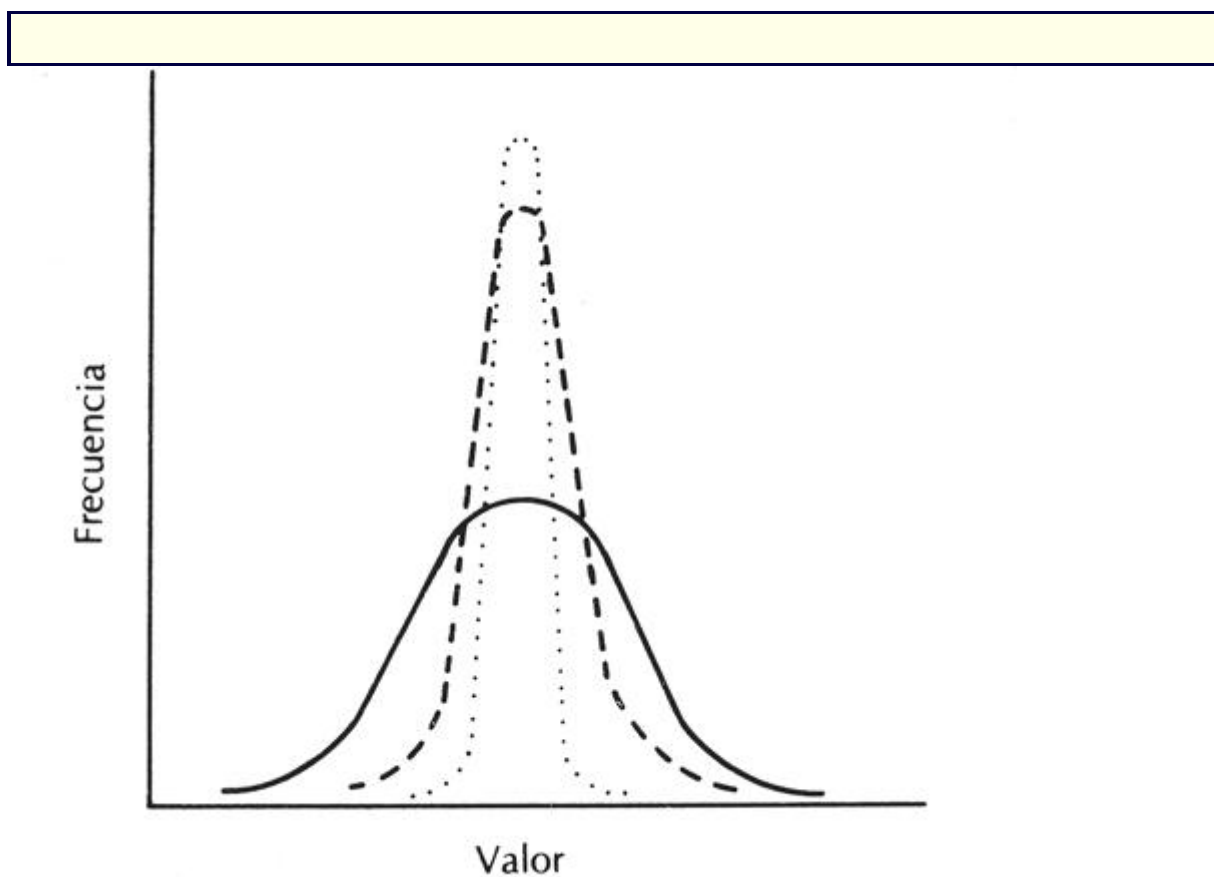


Figura 19-7 Distribuciones de frecuencia para tres métodos que tienen las mismas medias, pero diferentes distribuciones, σ . A (\cdots) tiene la distribución más estrecha, mientras que la distribución de C ($-$) es más ancha que la de B ($---$).

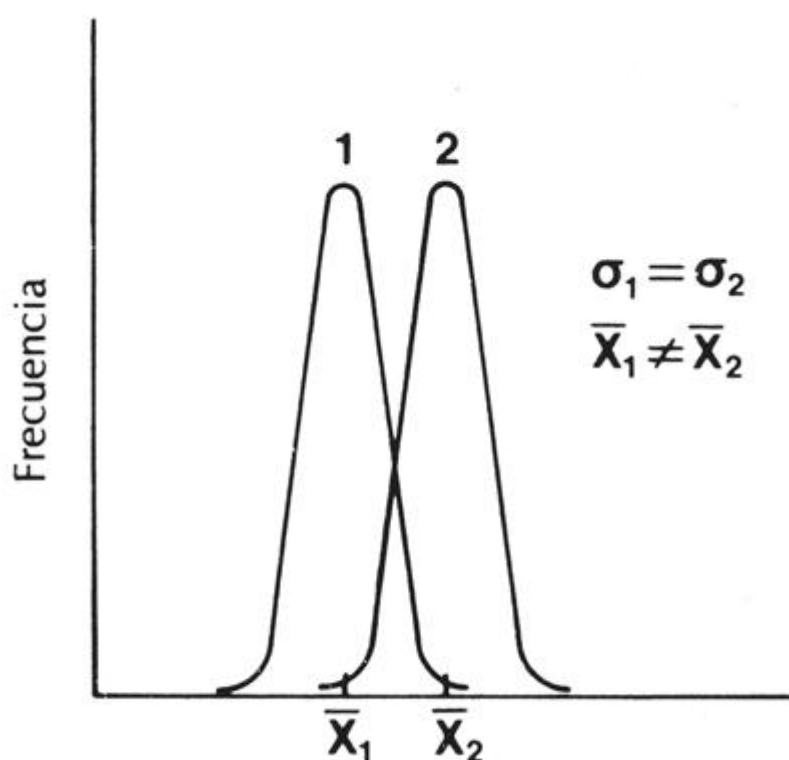


Figura 19-8 Distribución de frecuencias de análisis duplicados por dos métodos diferentes, 1 y 2. Ambos métodos son igualmente precisos ($\sigma_1 = \sigma_2$) pero se encuentran sesgados uno en relación con el otro (\bar{x}_1 no es igual a \bar{x}_2).

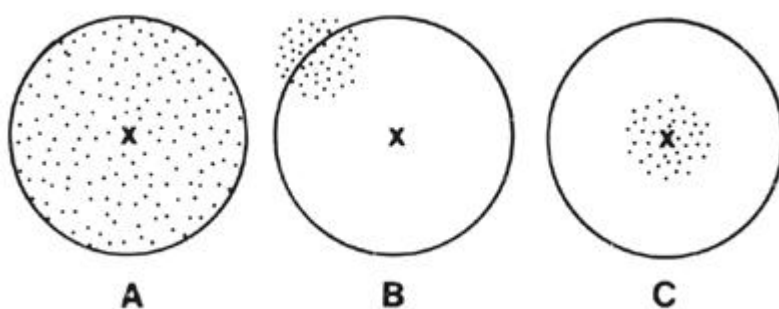


Figura 19-9 Las x de estos círculos que esquematizan el objetivo de la medición denotan el valor verdadero de una muestra. Los puntos mostrados en cada uno de los círculos A a C representan los resultados de tres análisis replicados por tres métodos diferentes: A, impreciso pero exacto; B, preciso pero inexacto; C, exacto y preciso.

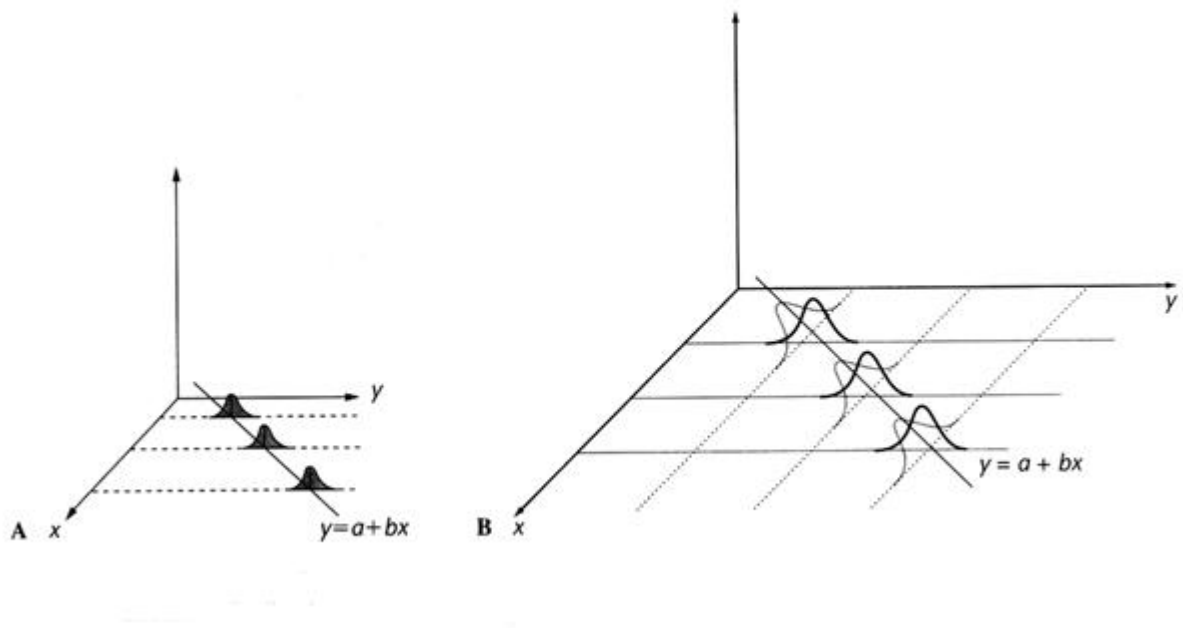


Fig. 19-10 A, Distribuciones gaussianas de valores de y alrededor de una línea de regresión lineal simple. B, Distribución gaussianas alrededor de la regresión de Deming.

CAPÍTULO 20

20. Intervalos de Referencia y Límites de Decisión Clínicos.

Por: Edward A. Sasse

Definición de un intervalo de referencia

Terminología

Lineamientos generales del protocolo para obtener y establecer intervalos de referencia asociados con el estado de salud.

Selección de individuos de referencia.

Variables analíticas y preanalíticas.

Características del método analítico.

Análisis de los valores de referencia

métodos estadísticos

intervalos de confianza

Tratamiento de las observaciones fuera de rango.

Partición de los valores de referencia

Transferencia



Presentación de los intervalos de referencia

Intervalos de referencia intraindividuales

Límites para tomar decisiones clínicas,

Teoría de la predicción de valores

Límites para tomar decisiones médicas

Curva característica receptor-operador.

OBJETIVOS

- ♦ Establecer el propósito de los intervalos de referencia e identificar las consideraciones primarias del proceso de muestreo para su determinación.
- ♦ Sugerir una aproximación estadística para establecer un intervalo de referencia para distribuciones no gaussianas.

Términos clave

análisis de decisiones Estrategia que consiste en comparar riesgos y beneficios de predecir un diagnóstico o resultado verdaderos.

anormal resultados que caen fuera de los intervalos de referencia, observados en personas con una enfermedad o con un estado de salud no totalmente aceptable.

curva de características receptor-operador (CRO) Presentación gráfica de la discriminación entre enfermedad y no enfermedad, que se elabora graficando la sensibilidad como uno de las variables.

desviación estándar Es una medida de variabilidad. En la distribución gaussiana, dos desviaciones estándar por encima y por debajo de la media, comprenden el 95% de la población de datos, y una desviación estándar por encima y por debajo de la media representa el 68.3% de la población.

distribución de referencia Distribución de los valores de referencia. Hipótesis que considera que la distribución de los valores de referencia de la población de referencia puede ser probada por medios estadísticos.

distribución log normal Distribución de una población gaussiana simétrica obtenida mediante una gráfica del logaritmo de los datos.

distribución normal logarítmica Una muestra de valores con una cola larga hacia la derecha que frecuentemente puede convertirse en una distribución gaussiana con el uso de valores logarítmicos.

especificidad Término usado para describir la probabilidad que el resultado de una prueba de laboratorio sea negativo (o sea, dentro del intervalo de referencia) en ausencia de enfermedad. Se calcula dividiendo los verdaderos negativos divididos entre la suma de los verdaderos negativos y los falsos positivos.

gaussiana una distribución estadística simétrica, también llamada distribución normal.

grupo de la muestra de referencia Un adecuado número de individuos de referencia seleccionados para representar a la población de referencia.

individuo de referencia Individuo seleccionado con base en criterios predeterminados. Usualmente es importante definir el estado de salud del individuo, edad, raza y sexo.

intervalo de referencia Es el intervalo que se encuentra entre dos límites de referencia y que incluye dichos límites. Se designa como el intervalo central de valores confinado por el límite de referencia inferior y el límite de referencia superior en ciertos percentiles

designados. Por ejemplo, para la glucosa en ayunas el intervalo de referencia del percentil central 95, es de 65 a 110 mg/dL, esto quiere decir que el 95% de la población de referencia aparentemente sana tendrá valores de glucosa en ayunas de 65 a 110 mg/dL. (Aparece en el Manual de mejoramiento de la calidad en el Laboratorio Clínico de 1988, CLIA /88, como rango de referencia).

límite de referencia Valor o valores numéricos derivados de la distribución de referencia, empleados con propósitos descriptivos. Es común definir los límites de referencia de tal manera que una determinada fracción de los valores de referencia sea expresada como menor que, igual a, o mayor que el límite superior o inferior, respectivamente.

límites para tomar decisiones médicas Los valores o cambios en los valores que conducen a una intervención médica inmediata o a cambios en la conducta médica.

normal Un término con muchos significados, que incluyen aquellas personas no enfermas de la población y un término equivalente para la distribución gaussiana (para discusión ver este capítulo).

partición de los valores de referencia El proceso de separar los intervalos de referencia basándose en criterios tales como, edad, sexo, raza, así como los análisis estadísticos que muestran diferencias significativas entre las poblaciones.

prevalencia El número de personas que presentan una enfermedad en una población dada en un momento determinado, o se usa más frecuentemente como la tasa con la que se presenta una determinada enfermedad; también es llamada la *frecuencia de la enfermedad*.

población de referencia Grupo formado por todos los individuos de referencia. La población de referencia generalmente tiene un número indeterminado de sujetos por lo tanto es una entidad hipotética.

rango de referencia Es el rango completo (desde los mínimos hasta los máximos valores medidos) de valores de laboratorio de un grupo de personas no enfermas.

valores tope Aquellos valores límite por encima o debajo de los cuales el paciente se encuentra en estado anormal o resulta positivo para ciertas condiciones tales como abuso de sustancias.

saludable o sano Término relativo que debe ser definido para cada población de referencia.

sensibilidad Término empleado para describir la probabilidad de que una prueba de laboratorio sea positiva (esto es, fuera del intervalo de referencia) en presencia de la enfermedad. Se calcula dividiendo los verdaderos positivos entre la suma de los verdaderos positivos y los falsos negativos.

valor atípico Una observación que resulta de una población diferente a la población de referencia. Este valor puede ser un resultado erróneo o una observación hecha en un sujeto que no está dentro de las características de los individuos de referencia.

valor de referencia El valor (resultado de la prueba) obtenido de un individuo de referencia mediante la observación o medición de un compuesto analizado particular. Los valores de referencia se obtienen de un grupo de la muestra de referencia.

valor observado Valores cuantitativos (resultados de la prueba) obtenidos de un sujeto de prueba (un paciente) para ser comparados con los valores de referencia, distribuciones de referencia, límites de referencia o intervalos de referencia.

valor predictivo Probabilidad de que un resultado de laboratorio acertadamente muestre la presencia o ausencia de una enfermedad. Depende de la prevalencia real de una



enfermedad.

valor predictivo negativo La probabilidad de que un resultado de laboratorio que cae dentro de los intervalos de referencia refleje la verdadera ausencia de enfermedad. Se calcula dividiendo los verdaderos negativos entre la suma de los verdaderos negativos y los falsos negativos.

valor predictivo positivo Probabilidad de que un resultado de laboratorio que se encuentra por fuera del valor de referencia, refleje exactamente la presencia de enfermedad. Se calcula dividiendo los resultados verdaderos positivos entre la suma de los verdaderos positivos más los falsos positivos.

Definición de un Intervalo de Referencia

La interpretación médica de los datos de laboratorio clínico, es un proceso de decisión comparativo, en el cual el resultado de un examen de laboratorio de un individuo es comparado con el intervalo de referencia obtenido para los valores de referencia. Se requiere, por lo tanto, una gran confiabilidad en los valores aportados por los laboratorios clínicos y por los fabricantes de reactivos para diagnóstico. Los intervalos de referencia usados con mayor frecuencia generalmente, se encuentran definidos, de una manera deficiente.

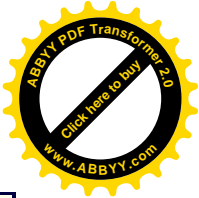
Los intervalos de referencia deben ser determinados en forma sistemática y científica de tal manera que proporcionen un grado aceptable de confianza para la toma de decisiones clínicas, lo que incluye la consideración de los factores significativos y variables introducidas por el proceso analítico en sí mismo. Entender el proceso empleado para establecer los intervalos de referencia ayuda a comprender mejor las limitaciones que éstos tienen.

Para facilitar la elaboración de valores de referencia confiables, El Comité Nacional de Estándares para Laboratorios Clínicos ("National Committee for National Laboratory Standards", o "NCCLS", en inglés) recientemente publicó un documento titulado "Como definir y determinar valores de referencia en el laboratorio clínico; lineamientos aprobados", documento NCCLS C28-A, el cual establece guías y procedimientos para determinar la validez de los valores e intervalos de referencia para pruebas de laboratorio cuantitativas.

El documento del NCCL clasifica los factores significativos y las variables que podrían afectar los intervalos de referencia, basándose en las recomendaciones hechas por el Grupo de expertos en la Teoría de los valores de referencia de la Federación Internacional de Química Clínica. Las recomendaciones aportadas por el NCCLS están dirigidas a elaborar un protocolo estándar para determinar intervalos de referencia que cumplan con los requisitos mínimos de confiabilidad.

Por consiguiente, la determinación de los intervalos de referencia debe seguir los lineamientos del protocolo del NCCLS. Sin embargo, existen ejemplos, particularmente en poblaciones pediátricas y geriátricas, en las que es difícil recopilar datos del número recomendado de individuos de referencia. En estos casos, se hace especialmente preeminente la selección correcta de los individuos de referencia. En esta categoría particular de pacientes los valores de referencia, aunque tienen sus limitaciones, son sin embargo muy útiles para la práctica médica.

Los valores de referencia pueden estar asociados con buena salud o con condiciones fisiológicas o patológicas determinadas y pueden ser empleados con diferentes propósitos.

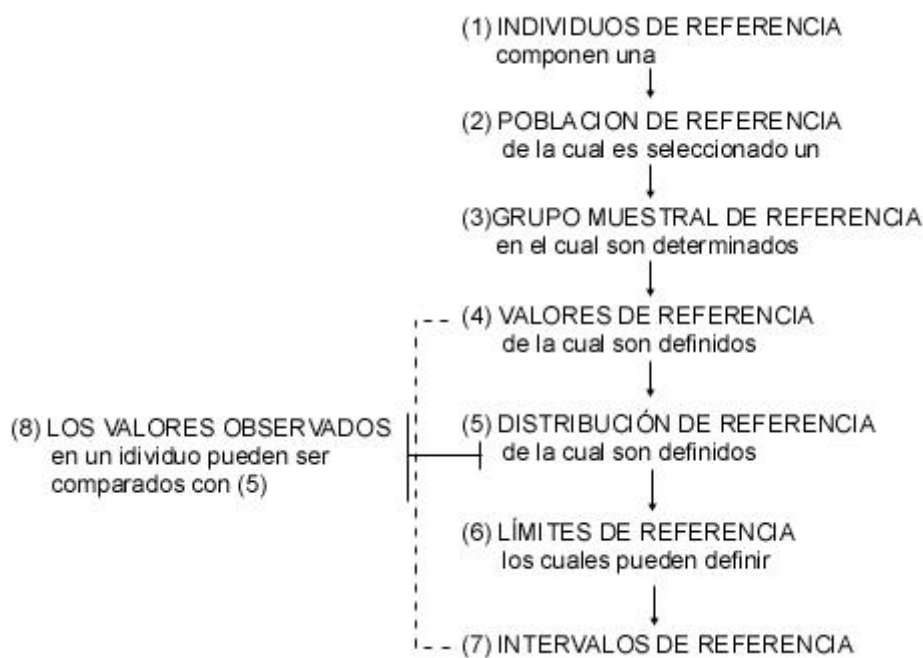


Por ejemplo, para establecer la sensibilidad y especificidad de una prueba de laboratorio, éste debe definir muy cuidadosamente la población. En todos los casos, los valores de referencia permiten la comparación de los datos observados con datos de referencia para sujetos de una población determinada. Esta comparación, por lo tanto, se convierte en parte del proceso de decisión.

Terminología

Las definiciones específicas de los términos permiten disminuir la ambigüedad de las descripciones y discusiones de los valores de referencia. Las definiciones listadas en los términos clave han sido propuestas por la EPTRV de la IFCC y el Consejo Internacional para la Estandarización en Hematología. Y han sido patrocinados por la Organización Mundial de la Salud, alrededor del mundo.

El siguiente esquema^{ref(339)} demuestra la relación que existe ente los términos definidos:



Los límites de referencia y los intervalos de referencia asociados, generalmente se estiman mediante un método estadístico. Los límites de referencia sirven solamente para describir el grupo de muestreo o la población de referencia y son estrictamente una función de las características de la población designada.

El término *rango de referencia* ha sido usado comúnmente, como un sustituto de “intervalo de referencia”, sin embargo, este término debe ser evitado. El “Rango” debe ser reservado para describir un grupo de valores definidos por los valores medidos reales, mínimos y máximos, esto es, el rango total de valores que componen el grupo.

Los intervalos de referencia que se usan más comúnmente para describir individuos sanos han sido conocidos como valores normales, refiriéndose a los valores de referencia



que se han observado en personas normales o sanas. Los resultados de las pruebas que se encuentran fuera de estos intervalos de referencia podrían, por lo tanto, ser observados en personas con enfermedades o en estados deficitarios de salud y por lo tanto ser denominados anormales. No obstante, es frecuente encontrar una superposición de los valores normales y anormales en enfermos puesto que la mayoría de los procesos de enfermedad asociados con análisis biológicos cambian de un modo continuo. Por esta razón los valores normales no siempre representan la ausencia de enfermedad, así como tampoco un valor que excede el límite definido siempre indica siempre un estado de enfermedad (Figs. 20-1 a 20-3). El uso del término normal en este contexto es ahora considerado como un término ambiguo.

La palabra normal tiene diferentes connotaciones en medicina de laboratorio que pueden causar confusiones. Los valores pueden ser descritos como normales, si la distribución observada sigue la distribución gaussiana teórica (normal). Sin embargo, los datos biológicos arrojados por un grupo muestral de referencia, a menudo no siguen una distribución gaussiana y el uso del término “normal” puede llevar a inferir, equivocadamente, que los datos son simétricos o tienen una distribución en forma de campana. Otros significados para “normal” son común, frecuente, usual y típico, términos que también pueden ser empleados para referirse a valores clínicos o biológicos. Por esa razón es mas preciso y menos confuso evitar términos como “valores normales” y reemplazarlos con “valores de referencia (o intervalo de referencia” obtenidos de individuos sanos”, “valores de referencia asociados a un estado de salud (o intervalos de referencia),” o coloquialmente, “valores de referencia sanos (intervalos).” Como se mencionó anteriormente, los intervalos de referencia también se pueden establecer debido a condiciones fisiológicas diferentes a la buena salud.

Resumen del Protocolo para Obtener Valores de Referencia y Establecer Intervalos de Referencia Asociados con la Salud

La recopilación o verificación de valores de referencia de individuos sanos y la subsecuente estimación del intervalo de referencia para un compuesto analizado determinado es un requisito de las regulaciones de la CLIA’88, *Federal Register* 57(40) Feb. 28 1992, y debe ser desarrollado de acuerdo con un protocolo bien definido. Esto implica seguir una secuencia de operaciones que aparecen a continuación:

Algunas veces se acepta transferir a un intervalo de referencia previamente establecido, basado en un estudio válido de valores de referencia realizado por un laboratorio donante o por una compañía fabricante, a un laboratorio receptor sin necesidad de realizar un nuevo estudio a gran escala. Esta transferencia es aceptable solamente si la población sujeta a los análisis y la metodología empleada, desde la preparación de los individuos de prueba hasta las mediciones analíticas en el laboratorio receptor, son iguales o apropiadamente comparables a las del laboratorio donante (ver el texto en el recuadro). La comparabilidad del sistema de medición analítico puede ser validado usando las técnicas discutidas en el Documento EP9-P de la NCCLS, *Comparaciones de Usuarios de Métodos de Laboratorio Clínico Cuantitativos Empleando Muestras de Pacientes: Lineamientos propuestos*.[ref\(340\)](#) Puede ser necesario llevar a cabo un estudio abreviado de



valores de referencia, como se describirá más adelante, para validar el intervalo de referencia transferido.

Guías del Protocolo para obtener valores de referencia e intervalos de referencia

1. Consulte la literatura médica y científica y enumere las posibles variaciones biológicas y las interferencias analíticas.
(En el caso de un compuesto analizado completamente nuevo, un laboratorio puede requerir realizar sus propios estudios)
2. Establezca los criterios de selección (o exclusión) y partición, así como un cuestionario apropiado diseñado para revelar esos criterios en los individuos de referencia potenciales.
3. Categorice los individuos de referencia potenciales, sobre la base de
de los hallazgos obtenidos a través del cuestionario y de otros ensayos apropiados para evaluar el estado de salud.
4. Excluya individuos del grupo muestral de referencia, en base a los criterios de exclusión u otras evaluaciones que indiquen la
carencia de una buena salud.
5. Seleccione los individuos de referencia apropiados.
6. Prepare a los individuos de referencia apropiada y
consistentemente para la toma de muestras, siguiendo los requerimientos específicos para el compuesto analizado y de acuerdo con la práctica rutinaria
de atención de pacientes.
7. Colecte y procese adecuada y uniformemente los especímenes biológicos, de acuerdo con la práctica rutinaria para especímenes
de pacientes.
8. Determine los valores de referencia analizando los especímenes de acuerdo a la metodología analítica respectiva en condiciones bien definidas.
9. Examine los datos de los valores de referencia y prepare un histograma
10. Identifique errores en los datos y valores atípicos.
11. Analice los valores de referencia, esto es, seleccione un método estadístico
de estimación y determine los límites de referencia, así como el intervalo de
referencia (incluyendo la partición en subclases para intervalos de referencia separados sí es procedente)
12. Documente todas las etapas anteriores y procedimientos.

Selección de los Individuos de Referencia



La salud es una condición relativa que carece de una definición universal. Definir lo que debe ser considerado como sano o saludable se convierte en el problema inicial de cualquier estudio, y el establecimiento de los criterios para excluir a los individuos no sanos de una muestra de referencia es el primer paso para seleccionar a los individuos de referencia. Frecuentemente, solo es posible determinar que un individuo determinado se encuentra aparentemente libre de enfermedad, esto es, que no tiene una condición médica específica que pudiera afectar el estudio del intervalo de referencia. En algunos casos, los individuos con afecciones menores o con condiciones médicas “no relacionadas” pueden ser usados como individuos de referencia. Sin embargo, generalmente es difícil estimar el potencial fisiológico y farmacológico que afecta a estos sujetos por lo que se requiere tener precauciones.

La selección de los individuos de referencia para un estudio de valores de referencia es importante y debe ser sistemática.[refs\(341\)](#) Cada institución o investigador puede tener diferentes criterios de salud, estos criterios deben ser definidos antes de iniciar el estudio. Como mínimo se recomienda que el investigador establezca una lista de selección, exclusión, y criterios potenciales de partición (se muestran ejemplos en las Tablas 20-1 y 20-2) y utilice un cuestionario para evaluar esos criterios en los posibles individuos de referencia. El uso de cuestionarios diseñados es una de las mejores formas de implementar consistentemente la exclusión y los criterios de partición. Las formas deben ser sencillas, no intimidatorias, que requieran respuestas del tipo *si* o *no*. El cuestionario puede ser empleado con mediciones simples, tales como, presión sanguínea, estatura y peso, y acompañarse de una entrevista en la cual es pertinente preguntar a los individuos si se consideran en buen estado de salud. Se debe incluir también, información adicional como nombre, dirección y teléfono, número de identificación, para facilitar ponerse en contacto con la persona en caso de que se obtengan resultados anormales, caso en el cual es obligatorio informar al individuo o a su médico. En otros casos, es apropiado usar cuestionarios anónimos para obtener la información requerida, siendo imprescindible el uso de sistemas de numeración. (El individuo de referencia debe ser responsable de contactar al laboratorio para conocer si el resultado de sus análisis presenta algún problema y si requiere un estudio de seguimiento.) En todos los casos, se debe establecer una política de confidencialidad con el paciente.

Se debe obtener el consentimiento informado de los individuos de referencia para la recolección de muestras y la realización de pruebas. En algunos casos puede requerirse la revisión y aprobación del protocolo por parte de un comité institucional de investigación en humanos. En el documento NCCLS-28 A aparece un cuestionario de muestra. No es absolutamente necesaria la investigación del estado de salud a través de un examen médico y pruebas de laboratorio. Sin embargo, si estas pruebas se realizan, aumentará la confiabilidad de la determinación de los intervalos de referencia. Todos los criterios y evaluaciones realizadas para la selección de individuos deben ser documentadas para que otros puedan, a su vez, evaluar el estado de salud del grupo muestral de referencia.

No todos los individuos de referencia seleccionados para determinar intervalos de referencia asociados con estados de salud deben ser adultos jóvenes sanos, pero sí deben ser representativos de población que usa los servicios del hospital o centro de salud en



donde los resultados serán empleados. Para algunos compuestos analizados en particular, es deseable una población “estándar” de adultos jóvenes sanos. En otros casos, puede ser mas apropiados el estudio de intervalos de referencia por grupos de edad. Para poblaciones de mayor edad es recomendable apoyar el diagnóstico de enfermedad con pruebas adicionales. No deben definirse poblaciones de pacientes, como individuos de referencia libres de enfermedad, a menos que sea absolutamente necesario, como en ciertos casos de poblaciones pediátricas o geriátricas

Es necesario determinar para cada compuesto analizado si existen diferencias relacionadas con la edad, si estas diferencias son clínicamente importantes, y si el uso de subgrupos de referencia por edad será clínicamente apropiado. Para ciertos componentes biológicos, las diferencias relacionadas con la edad son consistentes con la buena salud y son parte de un proceso normal de crecimiento y maduración, por ejemplo los niveles de fosfatasa alcalina en niños versus adultos. Sin embargo, para los niveles de otras sustancias, como el colesterol o posiblemente la hormona de crecimiento en individuos viejos, el uso de diferentes niveles para reflejar diferencias de edad puede no ser adecuado desde el punto de vista médico cuando se desarrollan intervalos de referencia asociados con la salud. Consecuentemente, determinar la necesidad de separar los intervalos de referencia por subgrupos de edad en intervalos de grupos de edad especificados, es una decisión médica compleja. La revisión de la literatura puede ser de ayuda al momento de hacer esta evaluación.

Los términos *a priori* y *a posteriori* son usados para describir dos métodos generales de seleccionar individuos de referencia de una población de referencia. Un muestreo *a priori* es un método que se emplea más bien para procedimientos de laboratorio establecidos y bien documentados. Los criterios de partición y de exclusión bien definidos, deben ser establecidos previamente a la selección de los individuos de referencia. Para los métodos establecidos una completa revisión de la literatura permitirá identificar fuentes conocidas de variación biológica, haciendo posible a los investigadores establecer criterios de exclusión y partición así como desarrollar un cuestionario adecuado. Si es necesario, los individuos de referencia son posteriormente seleccionados y divididos en subclases. Este procedimiento debe hacerse antes de recolectar cualquier muestra de sangre. El número de individuos de referencia seleccionados debe ser estadísticamente válido.

El enfoque *a posteriori* es especialmente apropiados para procedimientos de laboratorio nuevos o poco estudiados, de los cuales existe muy poca información en la literatura. En un muestreo *a posteriori* el proceso de exclusión y partición tiene lugar después del muestreo y de los análisis de las pruebas. Ya que los factores que definen una subclase son desconocidos, el cuestionario para este enfoque debe ser más detallado que aquel diseñado para un proceso de muestreo *a priori*. Generalmente el enfoque *a posteriori* requiere de un gran número de sujetos y una gran capacidad de computación para que los datos puedan ser implementados eficazmente.

Variables Preanalíticas y Analíticas

Los resultados analíticos de las poblaciones de referencia se encuentran afectados por



variables analíticas y preanalíticas. Por lo tanto, cuando se determinan dichos intervalos de referencia, todas estas variables deben ser consideradas y controladas consistentemente.^{ref(342)} Además, es importante que los sujetos de referencia y las muestras sean manejados en la forma aprobada^{refs(343)} y de la misma manera como se manejan los pacientes y las muestras en las situaciones de análisis clínicos. Todas las variables preanalíticas discutidas en detalle en el Capítulo 3 y revisadas en la Tabla 20-3 deben ser consideradas cuidadosamente, controladas si es necesario y documentadas.

Características del Método Analítico

La validez de la información proporcionada por el laboratorio es crítica, por eso se debe describir en detalle el método elegido para el análisis de las muestras, informando claramente la exactitud, precisión, límite mínimo de detección, linealidad, recuperación, y características de las interferencias. También requieren control y documentación otros factores que afectan el desempeño analítico. Estos incluyen equipos o instrumentación, reactivos, (incluyendo agua), estándares de calibración y métodos de cálculo.

Se debe determinar la variación de los reactivos lote a lote, de los tecnólogos y si la prueba ha de ser realizada en más de un instrumento, de la variabilidad entre instrumentos. La participación de más de un tecnólogo y el uso de más de un lote de reactivo deben ser incorporados en el protocolo del estudio

Es importante documentar la validez de los datos obtenidos durante el estudio de intervalos de referencia. Los materiales de Control de Calidad empleados durante la determinación de dichos intervalos de referencia, deben ser analizados de la misma manera que las muestras de los pacientes. Esto no solo sirve para monitorear el protocolo analítico usado durante el proceso, sino también asegura la equivalencia de resultados en el largo plazo.^{ref(344)} Idealmente, la recopilación de los datos de los especímenes analizados debe hacerse durante varios días, para obtener valores que reflejen el promedio de la variación intercorridas. (ver Capítulo 21). Además, es esencial valorar las interferencias de los constituyentes que se encuentran naturalmente.

Análisis de los Valores de Referencia^{ref(345)}

Métodos estadísticos

Se define como intervalo de referencia el espacio entre dos números y que además los incluye: un límite de referencia superior y uno inferior. Se estima que esos dos números, abarcan un porcentaje de valores de la población de la cual fueron seleccionados los sujetos de referencia (generalmente el 95%). Para la mayoría de los compuestos analizados, los límites de referencia inferior y superior se encuentran entre los percentiles 2.5 y 97.5, respectivamente, de la distribución de valores subyacente. En algunos casos sólo uno de los límites de referencia tiene importancia médica, generalmente el límite superior, es decir, el correspondiente al percentil 97.5.

Hay dos métodos estadísticos generales para determinar estos límites: los métodos



no paramétricos y los paramétricos (ver también el Capítulo 19). Solberg^{refs(346)} ha publicado presentaciones detalladas de estos dos métodos. El método no paramétrico de estimación, no hace suposiciones específicas en lo que concierne a la forma matemática de la distribución de probabilidades representada por los valores de referencia observados. El método paramétrico, como es aplicado en la práctica, funciona bajo la premisa de que los valores observados o algunas transformaciones matemáticas de dichos valores, siguen una curva de probabilidad gaussiana (o sea, “normal”). Ya que los valores de referencia de muchos compuestos analizados no siguen la curva gaussiana, el uso del método paramétrico requiere la transformación de los valores a otras escalas de medida que permita normalizarlos. Esto requiere, a su vez, seleccionar la transformación más adecuada (como la logarítmica, exponencial, o alguna otra función de la escala original) y posteriormente probar sí, con esta nueva escala, los valores de referencia se ajustan realmente para conformar una distribución gaussiana. Las pruebas de bondad de ajuste de chi cuadrada y la prueba no paramétrica de Kolmogorov-Smitnov para distribución acumulada, se pueden utilizar para determinar si los valores de referencia tienen una distribución gaussiana. Este procedimiento puede requerir un manejo moderadamente complejo de la teoría estadística y de programas de computadora.

El documento guía de la NCCLS¹, recomienda que los intervalos de referencia sean estimados por medio de métodos no paramétricos y que para determinar el intervalo de referencia sea empleado un mínimo de 120 valores. El método no paramétrico es simple, dependiendo solamente de las categorías de datos de referencia ordenados como valores ascendentes. Como ejemplo, en la Tabla 20-4 se presenta la frecuencia de distribución de los valores de referencia del calcio. La categoría de observación del percentil, es el percentil multiplicado $(n+1)$ veces el numero de grados de libertad, de manera que para 120 valores, la categoría de la observación del 2.5^{avo} percentil es 3, esto es, $0.025 \times 121 = 3.025$; y la categoría para la observación del 97.5^{avo} percentil es 118, esto es, $0.975 \times 121 = 117.975$. Esto está indicado en la Tabla 20-4 con las marcas • y ♦ respectivamente. Usando valores categorizados para estimar los límites de referencia superior e inferior, obtenemos los siguientes intervalos de referencia del 95%: de 89 a 102 mg/L para mujeres y de 92 a 103 mg/L para hombres, o de 91 a 103 mg/L para la población combinada.

Empleando el método no paramétrico, es imposible distinguir entre dos percentiles de una distribución, a menos que el número de observaciones, n , sea igual a $(100/P)-1$, donde P es la diferencia entre los dos percentiles. En consecuencia, el método no paramétrico requiere un mínimo absoluto de 39 mediciones para distinguir el 2.5^{avo} percentil del 5^{avo} o el 95^{avo} percentil del 97.5^{avo}, $n = (100/2.5) - 1 = 39$. Reed y colaboradores^{ref(347)} han sugerido que se debe asegurar un mínimo de 120 observaciones, uno para cada grupo de referencia, permitiendo así que los límites de confianza del 90% sean computados no paramétricamente, para cada límite de referencia en los percentiles 2.5^{avo} y 97.5^{avo}. Para estimar los límites de estos mismos percentiles con un 95% de confianza, se necesitan 153 valores de referencia; para un 99% de confianza, se necesitan 198 valores. Recientemente Lott y colaboradores^{ref(348)} usando la técnica de simulación Monte Carlo y un gran número de muestreos de una población de estudiantes de medicina, encontraron que el incremento en el tamaño de la muestra tubo un efecto estabilizador en los percentiles 25^{avo} y 97^{avo}. En alrededor de 200 individuos, los límites de referencia



inferiores y superiores para siete ensayos (Na, K, Cl, glucosa, hemoglobina, eritrocitos, hematocrito), determinados por métodos no paramétricos, llegaron a ser estables. Este hallazgo experimental concuerda con los 198 sujetos requeridos por criterios estrictamente estadísticos para definir los mismos límites con un nivel de confianza del 99%. Linnet^{ref(349)} ha propuesto que se deben obtener hasta 700 observaciones cuando se tienen distribuciones con un alto grado de sesgo. Claramente, mientras mayor sea el número de observaciones habrá una mayor exactitud en la estimación.

El número mínimo de 120 muestras se hizo bajo la suposición de que no se han suprimido observaciones del grupo de referencia. Sí se han eliminado observaciones aberrantes o atípicas, se deben seleccionar más sujetos hasta obtener cuando menos 120 valores de referencia aceptables para cada determinación de un intervalo de referencia. Además, si se requieren intervalos separados para diferentes subclases (por ejemplo, para clases de sexo o de edad), se debe determinar cada uno de dichos intervalos usando el número recomendado (al menos 120) de observaciones de referencia.

Intervalos de confianza.

Los límites de referencia computados en una muestra de sujetos seleccionados son estimados de los percentiles correspondientes en la población de individuos estudiada. Los intervalos de confianza son útiles por dos razones. Primero, porque alertan al investigador acerca de la variabilidad de los estimados y proporcionan una medida cuantitativa de esta variabilidad. Segundo, porque los intervalos de confianza se estrechan a medida que el tamaño de las muestras aumenta. De esta manera, el investigador puede tener una idea del mejoramiento en la precisión en un intervalo de referencia estimado del 95%, el cual podría ser obtenido de una muestra mayor de individuos de referencia.

La Tabla 20-5 muestra intervalos de confianza del 90% para los límites de referencia superior e inferior del 95% de calcio.

Tratamiento de las Observaciones Atípicas

Una suposición importante, implícita en la estimación de los límites de referencia, es, que el grupo de valores de referencia medidos, representa un conjunto de observaciones “homogéneas”. Esto significa que todos los valores vienen de la misma distribución de probabilidades fundamental.

Puede ser que esta condición se cumpla para la mayoría de los valores de referencia, pero que uno o dos de ellos sean muy diferentes de los demás, que pertenecen a una distribución de probabilidades. Cuando estos valores caen dentro de la distribución esperada, es prácticamente imposible identificarlos, a menos que la persona quien realiza los análisis bioquímicos tenga conocimiento que esas observaciones representan condiciones analíticas atípicas o son el resultado de errores aritméticos o de procedimientos. A menudo, sin embargo, estos valores “aberrantes” caen por fuera del rango del resto de las mediciones, pudiendo ser identificados como “atípicos” y que requieren de atención especial.

A menos que se conozca que estos valores atípicos son observaciones aberrantes,

esto es, el resultado de un error en el análisis o una falla en los controles preanalíticos aplicados al resto de los sujetos, se debe hacer énfasis en guardarlos mas que eliminarlos. Si un valor extremo fuera suprimido, los límites de referencia calculados no paramétricamente, basados en por lo menos 120 observaciones, no cambiarían o lo harían muy levemente. Hay muchas técnicas estadísticas disponibles para verificar las observaciones atípicas o aberrantes (Ver Barnett y Lewis).[ref\(350\)](#) Un ensayo propuesto por Dixon para evaluar las observaciones atípicas usa la relación D/R, en donde D representa la diferencia absoluta entre una observación extrema (grande o pequeña) y la siguiente observación mayor (o la más pequeña) y R es el rango de todas las observaciones incluyendo los extremos. Reed y asociados[ref\(351\)](#) han sugerido el uso de 1/3 como un valor del punto de corte de para la relación D/R, esto es, si el valor observado de D fuera igual o mayor a un tercio del rango R, la observación extrema sería suprimida. Para tamaños de muestra de 120 sujetos, este criterio es mas bien conservador; esto quiere decir que a menudo se cometería un error para rechazar las observaciones atípicas que realmente no son parte de la distribución. Sin embargo, en ausencia de evidencia de que el dato atípico sea en verdad una observación aberrante y dado que la distribución subyacente, a menudo, no es exactamente de forma gaussiana, la regla de 1/3 de la relación D/R parece apropiada, especialmente cuando los límites de referencia se han calculado por métodos no paramétricos. Es así como, las guías de la NCCLS apoyan el valor de este procedimiento y el punto de corte sugerido por Reed y asociados de un tercio cuando uno está buscando si los valores atípicos son estadísticamente significativos en un grupo de valores de referencia observados.

Cuando dos o tres valores atípicos se presentan del mismo lado de la distribución (esto es, todos son extremadamente grandes o extremadamente pequeños), la regla de un tercio (o cualquiera similar a la regla D/R) puede fallar al designar como estadísticamente significativo al más extremo de los valores atípicos, y por lo tanto enmascara la presencia de otros valores atípicos que tienen desviaciones más ligeras. El sentido común nos indica que, en tales casos, la regla de un tercio debe ser aplicada al valor atípico menos extremo como si este fuese el único atípico. Si la regla nos lleva a rechazar este valor, las observaciones más extremas deberán, naturalmente, ser también rechazadas. Si la regla no rechaza el valor menor extremo, se deben aceptar ya sea todos los valores extremos o, alternativamente, aplicar una prueba que permita considerar todos los valores externos colectivamente. Esta prueba es denominada *procedimiento en bloque*; ejemplos de esto son dados por Barnett y Lewis.[ref\(352\)](#) Cuando un valor atípico es rechazado, es recomendable probar el resto de los datos en busca de un valor o valores atípicos adicionales.

Partición de los Valores de Referencia

La posibilidad de separar intervalos de referencia requeridos para subclases de individuos debe ser considerada antes de iniciar el proceso de aseguramiento y análisis de las muestras de los individuos. Sin embargo, el uso de intervalos de referencia separados para hombres y mujeres o para diferentes grupos de edad, pueden no ser justificados a menos que esos

intervalos separados tengan utilidad clínica o estén bien fundamentados fisiológicamente. Cuando sea necesario realizarlos, se deben muestrear por lo menos 120 sujetos de cada sexo o grupo de edad o de otras subclases. Cuando se va a probar un nuevo compuesto analizado, la información necesaria para decidir si se requiere una partición, puede no estar disponible con anticipación.

Se asume generalmente, que cuando la diferencia entre las medias observadas de dos poblaciones de subclases es estadísticamente significativa, (nivel de probabilidad entre 5% y 1%) cada subclase asegura su propio intervalo de referencia. Sin embargo, cualquier diferencia observada, no importa cuan significativa sea clínicamente, llegará a ser estadísticamente significativa si el tamaño de la muestra es lo suficientemente grande. Es muy importante consultar con un profesional clínico apropiado para definir si esa es una diferencia clínicamente significativa. Si la diferencia entre los grupos *no es clínicamente significativa*, no debe hacerse la partición de los valores de referencia, aunque haya una diferencia estadísticamente significativa entre las medias (como lo determina la prueba *t*)

Investigaciones recientes de Harris y Boyd^{ref(353)} han mostrado, que diferencias entre las medias de las subclases o las diferencias en las desviaciones estándar (SD) de las subclases, aun cuando las medias sean idénticas, pueden conducir a desviaciones en la sensibilidad y especificidad para la detección de la enfermedad. Ellos encontraron que a veces hay necesidad estadística de separar los intervalos de referencia, puesto que ignorarlos podría dificultar la interpretación de los resultados de laboratorio como parte del proceso de diagnóstico. Una enfoque sugerido por Harris y Boyd^{ref(354)} consiste en probar la significancia estadística de las diferencias entre las medias de las subclases por medio del uso de la *prueba de z*, empezando con una muestra piloto de 60 sujetos en cada subclase, calculando intervalos de referencia separados para cada una. Si el valor de *z* calculado estadísticamente excede el valor “crítico” de *z* (ver Capítulo 19), se deben calcular intervalos de referencia separados para cada subclase. Además, si la desviación estándar mayor de una de dos subclases, excede 1.5 veces la desviación estándar menor, independientemente del valor de *z*, se deben calcular intervalos de referencia separados.

Para dos subclases, tales como hombres y mujeres o dos grupos de edad, la significancia estadística entre las medias de las subclases debería ser probada por medio de la *prueba de t de varianza separada*, discutida en el capítulo 19 (ec. 19-11), la cual se describe por la siguiente ecuación:

$$z = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\left[(s_1^2 / n_1) + (s_2^2 / n_2) \right]^{1/2}} \quad \text{Ec. 20-1}$$

en donde \bar{X}_1 y \bar{X}_2 son las medias observadas de los dos subgrupos, S_1 y S_2 son las varianzas observadas y n_1 y n_2 son el número de valores de referencia en cada subclase, respectivamente. Si se asumen, por lo menos, 60 sujetos en cada subclase, la prueba de *z* que es esencialmente una prueba no paramétrica, puede ser aplicada a los datos originales ya sea de que estos valores tengan o no una distribución gaussiana. La *z* estadística calculada debe ser comparada con un valor crítico.



$$Z = 3(n_{\text{promedio}}/120)^{1/2} = 3[n_1+n_2/240]^{1/2} \quad \text{Ec. 20-2}$$

Además, la desviación estándar mayor, por ejemplo S_2 , debe ser examinada para saber si excede $1.5 S_1$, o en forma equivalente, si $S_2/(S_2-S_1)$ es menor de 3 (ver cuadro en la página siguiente).

Por ejemplo, suponga que al final de la primera etapa de muestreo, el número promedio de valores de referencia en cada subclase es 60. Entonces, si el valor calculado de z excede al valor de z crítico (z^*), esto es, $3(60/120)^{1/2}=2.12$, o si la desviación estándar mayor excede 1.5 veces la desviación estándar menor, el muestreo debe continuarse hasta completar por lo menos 120 sujetos en cada subclase. La prueba de z y las comparaciones de las desviaciones estándares deben repetirse. Si el número promedio de sujetos en cada subclase, es ahora de 120, $z^* = 3$.

En este punto, si el valor de z calculado excede a z^* o si la desviación estándar mayor excede 1.5 veces la menor, independientemente del valor de z , se deben calcular intervalos de referencia separados para cada subclase, asumiendo que la diferencia entre los dos intervalos de referencia es probable que tenga importancia en la práctica médica. Si estas condiciones no son válidas, se debe calcular un solo intervalo de referencia para el grupo combinado de sujetos de referencia. El cuadro de la derecha da un ejemplo de este cálculo.

El problema es mas complicado cuando se comparan más de dos subclases. Una diferencia estadísticamente significativa encontrada cuando se comparan las medias de todas las subclases, puede, en efecto, ser atribuible solo a la diferencia ente las dos medias, tales como la media de una subclase versus la media de otros subgrupos combinados. Para evaluar los resultados de tres o más subclases, el análisis estadístico común sería el análisis de la varianza, si se asume que todas las subclases tienen la misma desviación estándar. En este caso se tendría que definir una prueba estadística de F crítica comparable al valor de z^* , definido antes (por lo tanto depende del tamaño de la muestra en cada subclase). En estos casos se ha sugerido buscar la ayuda de un consultor en estadística.

Las pruebas estadísticas y los criterios recomendados antes, pueden también aplicarse a la pregunta de si los intervalos de referencia calculados en un laboratorio pueden ser transferidos sin modificaciones para ser usados en otro laboratorio (ver la discusión procedente de transferencia).

En los ejemplos anteriores, las diferencia de los valores del calcio entre hombres y mujeres, aunque estadísticamente significativas, son pequeñas y pueden no tener importancia clínica. En este caso, la prueba de z es ciertamente sensible. Considerando la imprecisión del ensayo y los intervalos confianza de 90% calculados previamente para el calcio, un laboratorio puede escoger proveer solamente un rango de referencia de 91 a 103 mg/L para ambos, hombres y mujeres en este grupo de edad. La decisión final puede tomarse en base a la relevancia clínica de las diferencias estadísticamente significativas.

Cálculo de una valor z estadístico para verificar diferencia entre subclases

Ejemplo: Para probar la diferencia de las subclases entre los valores de referencia de calcio para hombres y mujeres, se necesitan las medias y las



desviaciones estándar de cada grupo:

Calcio mg/L $n_1 = n_2$			
X hombres	X mujeres	SD hombres	SD mujeres
98	97.5	3.1	2.9

Sustituyendo esos valores a la fórmula estadística dada en la pág.372, para el cálculo de z, los resultados son:

$$z = \frac{|98.0 - 95.7|}{\left[\frac{(3.1)^2}{120} + \frac{(2.9)^2}{120} \right]^{1/2}} = 5.94$$

El valor calculado de z excede el valor crítico $z^* = 3$ para $n = 120$ individuos, indicando que se debe considerar la separación de los intervalos de referencia para hombres y mujeres. La desviación estándar de la población de hombres es no mayor de 1.5 veces que la de mujeres y por lo tanto no indica una diferencia de subclases por este método.

Transfencia

Debido a que la determinación de intervalos de referencia confiables es una tarea grande y costosa, tiene beneficios desde el punto de vista económico transferir intervalos de referencia de un laboratorio a otro mediante un proceso adecuado de validación. A medida que se introducen nuevos métodos en los laboratorios, es poco realista esperar que cada laboratorio, grande o pequeño, desarrolle sus propios intervalos de referencia. En consecuencia, los laboratorios clínicos contarán con otros laboratorios o con compañías productoras de pruebas diagnósticas para proporcionar datos de valores de referencia adecuados que puedan ser transferidos. Para transferir adecuadamente valores de referencia se deben cumplir ciertas condiciones. Por ejemplo, el estudio original de los valores de referencia debe cumplir el mínimo de requerimientos de un estudio de validación de acuerdo a las guías de la NCCLS C28-A. Se deben establecer los detalles de los procedimientos preanalíticos y analíticos, el desempeño analítico, el grupo completo de valores de referencia, y el método de estimación de los intervalos de referencia.

Si se asume que el estudio original de valores de referencia fue adecuadamente realizado, la transferencia de un intervalo de referencia de una agencia de pruebas a otra involucrará dos problemas: la posibilidad de comparar dos sistemas analíticos y la comparabilidad de las dos poblaciones de prueba. Si ambas agencias de prueba no emplearon los mismos sistemas analíticos, la comparabilidad de los dos sistemas puede evaluarse como lo dictan los lineamientos propuestos por la NCCLS EP9-P.[ref\(355\)](#) Además, todos los procedimientos preanalíticos usados en el estudio de los valores de referencia, como la preparación de los sujetos de prueba, la recolección de las muestras, y



su manejo, deben ser los mismos que los empleados por el laboratorio receptor. En el cuadro que se presenta enseguida, se revisan los factores que deben ser considerados antes de transferir los intervalos de referencia. Sí a juicio del técnico del laboratorio, estos factores son consistentes con la operación del laboratorio que recibe y con la población de prueba, los intervalos de referencia pueden transferirse.

Las guías de la NCCLS aprueban dos procedimientos alternativos para el protocolo de transferencia; uno que usa $n=20$ y otro que usa $n=60$. Ambos protocolos cortos requieren las mismas consideraciones que los protocolos largos

Factores a considerar para la transferencia de Intervalos de referencia

1. Adecuación de los intervalos de referencia del laboratorio donador, (esto es la selección de los individuos de referencia, exclusiones y particiones, número de valores de referencia, método de estimación y validación de intervalos de referencia de acuerdo a los requerimientos de la NCCLS C28-A)
2. Comparabilidad de los factores preanalíticos (esto es, preparación de los sujetos, recolección y manejo de especímenes, y otros tópicos enumerados en la Tabla 20-3)
3. Comparabilidad del método analítico (esto es, el mismo [método cerrado] o un método diferente [emplear NCCLS EP9-P]).
4. Comparabilidad de sujetos de prueba de acuerdo a los factores enumerados en la Tabla 20-2.
5. Estudio de validación, si es necesario.

Presentación de los Intervalos de Referencia

Cada resultado clínico cuantitativo debe estar acompañado de una presentación adecuada de *intervalos de referencia*. Dichos intervalos de referencia deben reflejar la partición de las subclases que se han determinado como significativas para la población de referencia particular de ese laboratorio. En los reportes que incluyen resultados de muchos análisis deben resaltarse claramente aquellos resultados que no se encuentren dentro de los intervalos de referencia. Esto ayuda a indicar la relación entre los resultados de un paciente y los de los intervalos de referencia. Es una buena opción imprimir al lado de cada resultado la anotación “alto” o “bajo”.

En formas que tienen preimpresos los intervalos de referencia, se deben incluir también los correspondientes a las subclases. Un informe así puede resultar confuso, un mejor enfoque consiste en imprimir el intervalo de referencia apropiado para cada paciente



en particular. En la mayoría de los casos, los intervalos de referencia de las subclases serán determinados por la edad y sexo de los pacientes. Cualquier reporte que use intervalos de referencia de subclases debe incluir los factores de partición del paciente en el encabezado o en la sección de datos demográficos del informe.

Idealmente, debe estar disponible a todos los usuarios de los servicios del laboratorio una información detallada que describa la población de referencia y el estudio de intervalos de referencia. Esta información debe estar actualizada, cada vez que se realice un cambio en el laboratorio que afecte los intervalos de referencia en uso. Se debe enviar un memorandum indicando los cambios a todos los usuarios del laboratorio.

Intervalos de Referencia Intraindividuales

Los Institutos Nacionales de Salud (NIH) han mostrado que aun los individuos sanos estudiados durante varias semanas en condiciones estandarizadas, mostraron un rango de valores para diferentes compuestos analizados^{30,31} (ver Tabla 3-1, capítulo 3, para ejemplos de variaciones intraindividuales). Para el mismo compuesto analizado, algunos pacientes tuvieron valores dentro un estrecho rango, mientras que para otros la variación fue bastante grande. En algunos compuestos analizados, los mayores componentes de la variabilidad fueron las variaciones preanalíticas y analíticas, mientras que en otros fue la variación biológica. En el estudio del NIH, la dispersión de los resultados obtenidos entre cualquier individuo fue consistentemente menor que la de los intervalos de referencia basados en la población. Por consiguiente, un resultado anormal intraindividual de un individuo determinado, puede caer dentro de los llamados intervalos de referencia basados en la población sana. La variabilidad de los resultados también significa que un individuo sano, ocasionalmente, puede mostrar resultados que caen por fuera de un intervalo de referencia derivado de un intervalo central del 95% basado en la población y por lo tanto este individuos puede ser categorizado equivocadamente como anormal, mientras que otro individuo puede tener resultados anormales para su rango específico, pero caer dentro de los intervalos de referencia basados en la población y considerarse equivocadamente como normales.

Estos estudios han mostrado que es imposible desarrollar intervalos de referencia tomando como base 120 individuos sanos que sean apropiados para cada individuo. También han mostrado que es poco práctico desarrollar una serie de intervalos de referencia que consideren cada posible variable que pueda afectar la concentración de un compuesto analizado. En consecuencia, adoptamos el compromiso del intervalo de referencia basados en la población, desarrollado en aquellas condiciones que pueden ser controladas y que son razonablemente consistentes con las condiciones de prueba del paciente. D.S. Young^{ref(356)} ha discutido esto en más detalle.

Muchos clínicos desconocen los factores preanalíticos y analíticos que pueden afectar la interpretación de los resultados de las pruebas. Es importante que todos los clínicos entiendan, que todos los resultados que caen dentro de los intervalos de referencia, no siempre pueden considerarse que reflejen un estado de salud, y que no todos los resultados que caen por fuera de los intervalos de referencia pueden ser considerados



como anormales.

Es esencial que los laboratorios clínicos interactúen con los médicos clínicos que usan sus servicios para garantizar una interpretación adecuada de los valores de las pruebas de los pacientes.

Límites de Decisión Clínica

Teoría del valor predictivo.

Los límites de decisión clínica son diferentes de los intervalos de referencia porque están basados en la información médica relacionada con condiciones médicas específicas. Ellos pueden ser “valores críticos” que describen los límites de las concentraciones de compuestos analizados que requieren intervención médica inmediata, o cambios en el manejo del paciente. Pueden ser valores de puntos de corte diagnósticos con una alta asociación para enfermedad o condición clínica, o pueden ser límites de ventanas terapéuticas para agentes farmacológicos (ver Tabla 20-6).

El *Análisis de decisiones*, es una estrategia práctica para considerar los riesgos y beneficios de la toma de decisiones basada en la probabilidad cuantitativa de predecir el diagnóstico o resultado verdadero. Los enfoques cuantitativos respectivos empleados por el laboratorista o el clínico para evaluar las mediciones y datos de laboratorio clínicos han sido suficientemente documentadas y aceptadas generalmente.^{refs(357)} Los conceptos de sensibilidad, especificidad, y valores predictivos de los resultados de las pruebas, son fundamentalmente importantes para estos enfoques probabilísticos. Estos conceptos se aplican ahora con más frecuencia en el laboratorio clínico, no solo para establecer límites de decisión clínica, sino para ayudar en la determinación de los méritos o beneficios de una determinada prueba. (Ver Fig. 20-4)^{ref(358)}

Se define como *sensibilidad diagnóstica* de una prueba a la probabilidad de obtener un resultado positivo en un paciente con una determinada enfermedad, esto es, el porcentaje de individuos enfermos que tuvieron pruebas positivas. En contraste, se define como *especificidad diagnóstica* de una prueba a la probabilidad de obtener un resultado negativo en un paciente sin la enfermedad, esto es, el porcentaje de individuos sin enfermedad que tuvieron resultados negativos. Los verdaderos positivos (VP) son individuos con la enfermedad quienes tienen resultados positivos. Los falsos positivos (FP), son individuos sin enfermedad quienes fueron incorrectamente clasificados por la prueba, esto es, individuos sanos con resultados positivos. Los falsos negativos (FN) son individuos con enfermedad quienes fueron incorrectamente clasificados por la prueba, esto es, individuos enfermos con resultados negativos. Los verdaderos negativos (VN), son individuos sin enfermedad que fueron clasificados correctamente por la prueba, esto es, individuos sin enfermedad con pruebas negativas. Puesto que la sensibilidad es la relación de verdaderos positivos, el complemento, 100% menos la sensibilidad, es la relación de falsos negativos. Por ejemplo, si la sensibilidad es 75%, la relación de falsos negativos es 25%. De la misma forma, ya que la especificidad es la relación de verdaderos negativos, su complemento, 100% menos la especificidad es la relación de falsos positivos.

El *valor predictivo de una prueba positiva* es la probabilidad de que un paciente con un resultado positivo tenga la enfermedad, esto es la fracción obtenida cuando se



divide el número de verdaderos positivos entre el total de resultados positivos. *El valor predictivo de una prueba negativa* es la probabilidad de que un paciente con un resultado negativo no tenga la enfermedad, esto es la fracción obtenida cuando se dividen los verdaderos negativos entre el total de resultados negativos. *La eficiencia* de una prueba es la fracción de todas las pruebas individuales que fueron correctamente clasificadas tanto para los que tienen como para los que no tienen enfermedad. Esas probabilidades son convertidas y manejadas como porcentajes.

Los valores predictivos y la eficiencia diagnóstica están fuertemente influenciados por las relaciones de falsos positivos, falsos negativos y por la prevalencia de la enfermedad en la población que se está evaluando (ver Tabla 20-7). La importancia de la prevalencia (expresada como porcentaje) en la determinación de valores predictivos puede ser vista como otra manera o como rearrreglo y sustitución de los términos para los valores predictivos de un resultado positivo (PV+), aplicando la siguiente ecuación de equivalencia:

$$PV + = \frac{(\text{prevalencia} \cdot \text{sensibilidad}) \times 100\%}{[\text{prevalencia} \cdot \text{sensibilidad}] + [(1 - \text{prevalencia}) \cdot (1 - \text{especificidad})]} \quad \text{Ec 20-3}$$

Por lo tanto, para una prueba con una sensibilidad diagnóstica del 95% y una especificidad diagnóstica del 95%, el valor predictivo de obtener un resultado positivo en una población con una prevalencia del 50% es 95%. Sin embargo, si la prevalencia es del 5%, el valor predictivo positivo es del 50%, o para una prevalencia del 1% , el valor predictivo positivo será solamente del 16.1%. Cuando el VP + es 50%, el valor predictivo de la prueba no es mejor que el del azar, pudiéndose lanzar una moneda para decidir si un paciente con un resultado de una prueba positiva tiene realmente la enfermedad.

Es claro que, aún cuando, una prueba tenga una alta sensibilidad y especificidad y sea una buena prueba diagnóstica para una determinada población de pacientes, tendrá un desempeño menos bueno en otra población en donde la prevalencia de esa enfermedad sea muy baja. Por ejemplo, un resultado positivo de CC MB es más significativo en una población de pacientes en una unidad de cuidado cardíaco (con una prevalencia del 30 al 50%) que en una unidad de emergencia (con una prevalencia de infarto al miocardio de alrededor del 5%).

La sensibilidad de una prueba específica de laboratorio puede variar dependiendo del progreso de los diversos estadios en el desarrollo de la durante un tiempo relativamente largo. Esta variabilidad se ha visto, por ejemplo en, la aterosclerosis, cáncer, y diabetes. De esta manera, una prueba de marcador tumoral, puede tener una baja sensibilidad en los estadios tempranos del cáncer, pero mucho más alta sensibilidad en estadios avanzados del mismo cáncer. Por otra parte, ciertas pruebas pueden ser tan sensibles para detectar como para predecir enfermedades antes a la aparición de sus síntomas. El valor predictivo de las pruebas en una población, también será parcialmente dependiente de la proporción relativa de pacientes con la enfermedad que ha avanzado hasta niveles detectables.

Como regla general, las pruebas que son empleadas para tamizaje de enfermedades ocultas en la población general (baja prevalencia de la enfermedad) deben tener la más alta sensibilidad diagnóstica posible, acompañadas de un nivel aceptable de resultados falsos

positivos (especificidad). Generalmente se quiere maximizar tanto la sensibilidad como la especificidad. En el ejemplo dado arriba, si una prueba con una sensibilidad y especificidad del 95% es empleada como método de tamizaje de una enfermedad presente en la población con un 1% de prevalencia, el 83.9% de la población que tenga un resultado positivo, no tendrá la enfermedad. Si esta relación de valores falsos positivos es inaceptable, la especificidad de la prueba deberá ser incrementada a expensas de la sensibilidad. Alternativamente, si la sensibilidad diagnóstica y los valores predictivos positivos no son mutuamente aceptables, la prueba no puede ser empleada como método de tamizaje, pudiendo ser aplicada solo para aquellas poblaciones con altos niveles de prevalencia de la enfermedad.

Galen y Gambino^{ref(359)} han sugerido los siguientes lineamientos para decidir si una prueba debe tener la más alta sensibilidad, la más alta especificidad, los más altos valores predictivos positivos, o la más alta eficiencia. Por favor, noten que no es posible tener todos esos atributos al mismo tiempo.

ES deseable una alta sensibilidad (preferiblemente 100%) en las siguientes situaciones diagnósticas:

- Sí la enfermedad es grave pero no irremediable.
y
- Sí la enfermedad es tratable.
y
- Sí los resultados falsos positivos no producen al paciente un trauma serio físico, psíquico, o económico.

Ejemplo: El feocromocitoma puede ser fatal si es ignorado, pero diagnosticado a tiempo es curable en el 100%. Otros ejemplos son, fenilcetonuria, infecciones venéreas, y otras infecciones tratables.

Es deseable una alta especificidad (preferiblemente 100%) en las siguientes situaciones diagnósticas:

- Sí la enfermedad es grave y no es tratable o curable
y
- Sí el conocimiento que la enfermedad está ausente tiene un valor psicológico o para propósitos de salud pública.
y
- Sí los resultados falsos positivos pueden producir a un paciente un trauma serio psicológico o económico.

Ejemplo: Esclerosis múltiple y los carcinomas más ocultos. Estas enfermedades son graves y generalmente no tratables o curables.

Un valor predictivo alto para un resultado positivo es esencial en las siguientes situaciones diagnósticas:

- El tratamiento de un individuo con un resultado falso positivo puede traer graves consecuencias.

Ejemplo: Un cáncer oculto de pulmón donde el tratamiento con extirpación lobular o radioterapia tiene una morbilidad significativa.

Se desea una alta eficiencia en las siguientes situaciones diagnósticas:

- Si la enfermedad es grave pero tratable.
- y
- Si los resultados falsos positivos y negativos son igualmente graves o dañinos.

Ejemplo: Infarto de miocardio. La enfermedad puede ser fatal pero es tratable. Otras como lupus eritematoso, algunas leucemia y linfomas y diabetes mellitus.

Es obvio, que la estimación de ambos; el valor predictivo y la eficiencia de una determinada prueba, es altamente dependiente de la población de pacientes estudiada. La comparación de valores predictivos o de la eficiencia de diferentes pruebas o diferentes metodologías es válida sólo si las poblaciones estudiadas son las mismas. A menos que la población de pacientes estudiada sea cuidadosamente definida, lo suficientemente grande, y muy similar, los valores predictivos de diferentes estudios pueden conducir a decisiones erróneas si se emplean para juzgar los méritos o beneficios relativos de las pruebas. Por ejemplo, como se sugirió arriba, un estudio de valores predictivos o de eficiencia de un ensayo de CC MB para diagnóstico de lesión miocárdica, daría resultados diferentes si la población de pacientes estudiada pertenece a una unidad de cuidado intensivo cardíaco que si pertenece a una población de pacientes con dolor en el pecho en una unidad de emergencia. Se debe tener cuidado al comparar valores predictivos provenientes de estudios realizados en pacientes de unidades de cuidado crítico de diferentes instituciones porque las instituciones pueden tratar diferentes poblaciones de pacientes y emplear criterios específicos diferentes para la admisión a la unidad o para hacer el diagnóstico final.

Límites para la toma de decisiones médicas.

Otro uso importante de los criterios de sensibilidad, especificidad, y valores predictivos es la determinación de un valor del punto de corte óptimo o *límite de decisiones médicas* para una prueba de laboratorio clínico. La sensibilidad y especificidad diagnósticas dependen del valor del punto de corte seleccionado. Cuando se emplea un límite de decisiones médica relativamente bajo para CC- MB, la sensibilidad diagnóstica de la prueba puede aproximarse a 100% para el diagnóstico de lesión de miocardio (pocos o ningún resultado falso negativo), sin embargo la especificidad diagnóstica puede disminuir a un rango del 50% al 60% (un gran número de resultados falsos positivos). Cuando se emplea un valor del punto de corte alto, la sensibilidad puede mejorar pero la especificidad disminuye. Cuando se cambia el límite de decisión médica se establece un compromiso entre la sensibilidad diagnóstica y la especificidad de la prueba. La prueba perfecta, si esta existiera, en el valor del punto de corte perfecto, tendría una sensibilidad y especificidad del 100% y una eficiencia diagnóstica del 100%.

Ciertamente, tanto los laboratorios como los clínicos deben colaborar y ser capaces de balancear los resultados falsos positivos versus los falsos negativos, para cada situación diagnóstica. Cuando se escogen los límites de decisión médica, el conocimiento de la distribución de los resultados de los ensayos realizados en las poblaciones enfermas versus las no enfermas, puede ser de gran utilidad. (Fig. 20-1, 20-2, 20-3). Como se ilustró en las Figs. 20-2 y 20-3, la distribución de los resultados de las poblaciones sanas y enfermas,

comúnmente, se superpone. Para algunas enfermedades y ciertas pruebas, no todos los individuos con una determinada enfermedad tendrán siempre el resultado de esas pruebas por fuera del intervalo de referencia de la población sana. Por ejemplo, la distribución de los niveles de antígeno específico de próstata (PSA) en hombres con BPH (hipertrofia benigna de próstata), en hombres con cáncer de próstata y en hombres sanos, ha llevado a adoptar cuatro límites de decisión: de 0 a 4 ng/mL asociados con próstatas normales, de 4 a 10 ng/mL asociados a BPH pero rara vez con cáncer, de 10 a 20 ng/mL frecuentemente asociados a cáncer de próstata y >20 ng/mL siempre asociados a cáncer de próstata. Por consiguiente, en la medida en que la concentración de PSA aumenta, la probabilidad de enfermedad y la especificidad del ensayo también aumentan.

El uso clínico deseado de una prueba será, también, un factor en la selección del mejor valor del punto de corte. En un grupo clínico dado, las consecuencias de un resultado falso negativo pueden ser más graves que las de un falso positivo. Los resultados falsos negativos son completamente inaceptables cuando se trata de pruebas para detectar infecciones por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) en donadores de sangre y de transplante de órganos. Alternativamente, se puede causar menos daño al clasificar un paciente con un infarto agudo de miocardio IAM por una prueba de CC MB, cuando realmente lo tenía (falso positivo) que clasificarlo como negativo (falso negativo). Dar de alta de un departamento de emergencia a un paciente con un infarto de miocardio (IM) puede ser catastrófico para el paciente. Por otra parte, tampoco es deseable someter innecesariamente a un paciente a procedimientos diagnósticos o intervenciones riesgosas por haber reportado pruebas falsamente positivas. Además sería exageradamente costoso recibir muchos pacientes quienes no padecen IM en una unidad de cuidado intensivo. Galen y Gambino^{ref(360)} sugieren que el mejor valor del punto de corte empleado para clasificar un paciente como un caso de IM es el valor que produce la más alta eficiencia diagnóstica.

No hay una manera sencilla para seleccionar las combinaciones óptimas de sensibilidad y especificidad. Como se discutió anteriormente, la elección depende de la naturaleza de la enfermedad, de la población clínica, y del costo relativo de un resultado falso positivo o falso negativo. Los ensayos secuenciales, suplementarios o confirmatorios adicionales pueden compensar una prueba con una relación alta de resultados falsos positivos y minimizar las consecuencias indeseables asociadas.

Curva característica Receptor-Operador.

La capacidad de una prueba que utiliza una concentración específica de compuesto analizado para discriminar enfermedad de no enfermedad puede ser representada gráficamente por medio del uso de las curvas de análisis características receptor operador (CRO). Construyendo varias curvas CRO dentro de la misma gráfica, el personal del laboratorio puede comparar los beneficios de dos pruebas diferentes o el desempeño de una prueba en condiciones diferentes, como diferentes valores de puntos de corte o diferentes poblaciones de pacientes. En la Fig. 20-5 se observa un ejemplo de estas curvas (Zweig y asociados)^{ref(361)} mostrando la discriminación entre sujetos con y sin enfermedad arterial coronaria, en diferentes niveles de decisión, para apolipoproteína B, colesterol de baja densidad (LDL), relación apolipoproteína A1 a apolipoproteína B, y la relación de colesterol de alta densidad (HDL) y colesterol total. Para una buena discusión del uso de

las curvas CRO se deben referir al artículo de Zweig y asociados^{ref(362)} y a la revisión de Zweig y Campbell.^{ref(363)}

Una curva CRO se elabora graficando la sensibilidad de la prueba (relación de verdaderos positivos) versus 1 menos la especificidad (relación de falsos positivos). Los múltiples puntos en la curva representan la relación de verdaderos positivos y la relación de los falsos negativos empleando diferentes valores de puntos de corte para el diagnóstico o diferenciación de enfermedad versus no enfermedad. El punto de la curva que se encuentra más cercano a la esquina superior izquierda de la gráfica, representa el valor del punto de corte o límite de decisión que proporciona la mayor exactitud diagnóstica, esto es, la eficiencia de la prueba. El área bajo la curva representa la exactitud general de la prueba.

Hay otras maneras útiles de representar y examinar el valor diagnóstico relativo de diferentes valores de puntos de corte. Un ejemplo, es la gráfica de Gerhardt modificada^{ref(364)} como se utiliza en un estudio de la utilidad relativa de amilasa total, lipasa total, isoenzimas de la amilasa pancreática, y una isoforma de la lipasa, en el diagnóstico de pancreatitis aguda.^{ref(365)} Esas cuatro pruebas fueron usadas en la misma población de 81 pacientes con sospecha de pancreatitis aguda. En dicha población, 41 pacientes presentaron pancreatitis y 40 no. En la Fig. 20-6, las barras vacías sobre la línea de valor cero representan pacientes con pancreatitis y las barras rayadas debajo de la línea representan pacientes sin pancreatitis. Empleando esa gráfica, los investigadores pudieron juzgar la mejor discriminación o punto de corte para maximizar la sensibilidad o especificidad de cada prueba. Ellos también concluyeron que, por lo menos en este grupo de pacientes estudiados, la amilasa total fue una prueba deficiente para evaluar pacientes con “abdomen agudo” y la mejor prueba de elección fue la lipasa total.

Otras representaciones de valores de puntos de corte también útiles, son las que se muestran en las Figs. 20-4 y 20-7, para un ensayo inmunoquímico hipotético de CC-MB empleado en el diagnóstico de lesión del miocardio.^{ref(366)} Cuando el objetivo es la eficiencia diagnóstica, es útil elaborar una gráfica sencilla del porcentaje de eficiencia versus los valores del punto de corte diagnóstico. Lo más apropiado es obtener la mayor eficiencia en el punto de corte más bajo, ya que el incremento de los valores del punto de corte producirá más resultados falsos negativos. La Fig. 20-4, es interesante porque muestra la eficiencia diagnóstica graficada como una función de la combinación de dos valores de punto de corte, el CC MB en ng/mL y el índice del porcentaje relativo de CC MB sobre CC total. La máxima eficiencia diagnóstica en la población de pacientes definida para estos ensayos de CC y CC MB parece ser de 90% con un punto de corte para CC MB de 5 ng/mL y un índice relativo de 3%.

Los análisis de decisión que comprenden pruebas múltiples o pruebas combinadas pueden ser similares a los conceptos presentados aquí para la medición de un solo indicador variante, estos son discutidos en el texto de Galen y Gambino.^{ref(367)} Puede ser también muy complejo con respecto a las evaluaciones secuenciales o simultáneas de múltiples valores variantes de acuerdo al teorema de Bayes, como ha sido discutido por Statland y colaboradores.^{ref(368)}

Agradecimientos

Agradecemos los esfuerzos de los miembros de la NCCLS Subcomité de Intervalos de Referencia, quienes prepararon las Guías C28-P: Edward Sasse (Presidente), Kaiser J



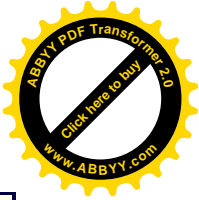
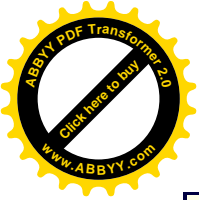
Aziz, Eugene K Harris, Sandy Krishnamurthy, Henry T Lee, Jr., Andy Ruland y Bette Seamonds. El C28-P fue modificado a C28-A, 1995.

Referencias

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards: *How to define and determine reference intervals in the clinical laboratory: approved guideline*, NCCLS document C28-A (ISBN 1-56238-269-1), Villanova, Penn., 1995, NCCLS. Copies of the current edition may be obtained from NCCLS, 771 E. Lancaster Avenue, Villanova, PA 19085.
2. Solberg HE: Approved recommendation (1986) on the theory of reference values. Part 1. The concept of reference values, *Clin Chim Acta* 167:111-118, 1987; *J Clin Chem Clin Biochem* 25:337-342, 1987; *Ann Biol Clin* 45:237-241, 1987; *Labmedica* 4:27-31, 1987.
3. PetitClerc C, Solberg HEL: Approved recommendation (1987) on the theory of reference values. Part 2. Selection of individuals for the production of reference values, *J Clin Chem Clin Biochem* 25:639-644, 1987; *Clin Chim Acta* 170:S1-S12, 1987.
4. Solberg HE, PetitClerc C: Approved recommendation (1988) on the theory of reference values. Part 3. Preparation of individuals and collection of specimens for the production of reference values, *Clin Chim Acta* 177:S1-S12, 1988.
5. Solberg HE, Stamm, D: Approved recommendation on the theory of reference values. Part 4. Control of analytical variation in the production, transfer and application of reference values, *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 29:531-535, 1991.
6. Solberg HE: Approved recommendations (1987) on the theory of reference values. Part 5. Statistical treatment of collected reference values: determination of reference limits, *J Clin Chem Clin Biochem* 25:645-656, 1987; *Clin Chim Acta* 170:S13-S32, 1987.
7. Dybkaer R, Solberg HE: Approved recommendations (1987) on the theory of reference values. Part 6. Presentation of observed values related to reference values, *J Clin Chem Clin Biochem* 25:657-662, 1987; *Clin Chim Acta* 170:S33-S42, 1987; *Labmedica* 5:27-30, 1988.
8. National Committee for Clinical Laboratory Standards: User comparison of quantitative clinical laboratory methods using patient samples: proposed guideline. NCCLS document EP9-P (ISBN 1-56238-021-4), Villanova, Penn., 1985, NCCLS.
9. Solberg HE: Establishment and use of reference values. In Tietz Textbook of clinical chemistry, 2nd ed., Burtis CA, Ashwood ER, editors, Philadelphia, 1994, Saunders.
10. Schultz EK: Analytical goals and clinical relevance of laboratory procedures. In Tietz NW, editor: Textbook of clinical chemistry, Philadelphia, 1986, Saunders.
11. Koch DD, Peters T Jr: Selection and evaluation of methods. In Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 2nd ed., Burtis CA, Ashwood ER, editors, Philadelphia, 1994, Saunders.
12. Stamm D: Control of analytical variation in the production of reference values. In Grasbeck R, Alstrom T, editors: Reference values in laboratory medicine, New York, 1981, Wiley & Sons.
13. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Internal quality control testing: principles and definitions: approved guideline, NCCLS document C24-A (ISBN 1-56338-112-1), Villanova, Penn., 1990, NCCLS.
14. Statland BE, Winkel P: Selected preanalytical sources of variation in reference values. In Grasbeck R, Alstrom T, editors: Reference values in laboratory medicine, New York, 1981, Wiley & Sons.
15. Hjelm M: Preparing reference individuals for blood collection. In Grasbeck R, Alstrom T, editors: Reference values in laboratory medicine, New York, 1981, Wiley & Sons.
16. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture: approved standard, ed 3, NCCLS document H3-A3 (ISBN 1-56238-108-3), Villanova, Penn., 1991, NCCLS.
17. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by skin puncture: approved standard, ed 3, NCCLS document H4-A3 (ISBN 1-56238-035-2),



- Villanova, Penn., 1991, NCCLS.
18. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Percutaneous collection of arterial blood for laboratory analysis: approved standard, NCCLS document H11-A (ISBN 1-56238-041-9), Villanova, Penn., 1985, NCCLS.
 19. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Collection, transport, and preparation of blood specimens for coagulation testing and performance of coagulation assays: approved guideline, ed 2, NCCLS document H21-A2 (ISBN 1-56238-050-8), Villanova, Penn., 1986, NCCLS.
 20. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Collection and transportation of single-collection urine specimens: proposed guideline, NCCLS document GP8-P (ISBN 1-56238-027-3), Villanova, Penn., 1985, NCCLS.
 21. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Collection and preservation of timed urine specimens: proposed guideline, NCCLS document GP13-P (ISBN 1-56238-030-3), Villanova, Penn., 1987, NCCLS.
 22. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Procedures for the handling and processing of blood specimens: approved guideline, NCCLS document H18-A (ISBN 1-56238-110-5), Villanova, Penn., 1990, NCCLS.
 23. Reed AH, Henry RJ, Mason WB: Influence of statistical method used on the resulting estimate of normal range, *Clin Chem* 17:275-284, 1971.
 24. Lott JA, Mitchell LC, Moeschberger ML, Sutherland DE: Estimation of reference ranges: how many subjects are needed, *Clin Chem* 38:648-650, 1992.
 25. Linnet K: Two-stage transformation systems for normalization of reference distributions evaluated, *Clin Chem* 33:381-386, 1987.
 26. Barnett V, Lewis T: Outliers in statistical data, New York, 1978, Wiley & Sons, pp 68-73.
 27. Dixon WJ: Processing data for outliers, *Biometrics* 9:74-89, 1953.
 28. Harris EK, Boyd JC: On dividing reference data into subgroups to produce separate reference ranges, *Clin Chem* 36:265-270, 1990.
 29. Harris EK: Personal communication.
 30. Cotlove E, Harris EK, Williams GZ: Biological and analytical components of variation in long-term studies of serum constituents in normal subjects, III: physiological and medical implications, *Clin Chem* 16:1028-1032, 1970.
 31. Young DS, Harris EK, Cotlove E: Biological and analytical components of variation in long-term studies of serum constituents in normal subjects, IV: results of a study designed to eliminate long-term analytic deviations, *Clin Chem* 17:403-410, 1971.
 32. Young DS: Determination and validation of reference intervals, *Arch Pathol Lab Med* 116:704-709, 1992.
 33. Statland BE, Winkel P, Burke DM, Galen RS: Quantitative approaches used in evaluating laboratory measurements and other clinical data. In *Clinical diagnosis and management by laboratory methods*, Henry JB, editor: Philadelphia, 1979, Saunders.
 34. Galen RS, Gambino SR: Beyond normality: the predictive value and efficacy of medical diagnoses, New York, 1975, Wiley & Sons.
 35. Zweig MH, Broste SK, Reinhart RA: ROC curve analysis: an example showing the relationships among serum lipid and apolipoprotein concentrations in identifying patients with coronary artery disease, *Clin Chem* 38:1425-1428, 1992.
 36. Zweig MH, Campbell G: Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine, *Clin Chem* 39:561-577, 1993.
 37. Gerhardt W: The Bayes approach: systematic graphic evaluation of diagnostic tests. In Keller H, Trendelenburg CH, editors: *Data presentation, interpretation*, New York, 1989, Walter de Gruyter.
 38. Lott JA, Lu CJ: Lipase isoforms and amylase isoenzymes: assays and application in the diagnosis of acute pancreatitis, *Clin Chem* 37:361-368, 1991.
 39. Obzansky D: Personal communication, Wilmington, Del.



Tablas

Tabla 20-1 Ejemplos de posibles criterios de exclusión.

Consumo de alcohol	Enfermedad reciente
Presión sanguínea anormal	Lactancia
Donación frecuente de sangre	Obesidad
Abuso de drogas	Ocupación
Medicamentos con prescripción	Contraceptivos orales
Medicamentos sin prescripción	Embarazo
Medio ambiente	Cirugía reciente
Estado de ayuno o no ayuno	Consumo de tabaco
Factores genéticos	Transfusiones recientes
Hospitalización actual o reciente	Abuso de vitaminas

De: National Committee for Clinical Laboratory Standards: *How to define and determine reference intervals in the clinical laboratory: approved guideline*, NCCLS Document C28-A, Villanova, Penn., 1995, NCCLS.

Tabla 20-2 Ejemplos de posibles factores de partición

Edad	Postura al tomar la muestra
Grupo sanguíneo	Raza
Variación circadiana	Sexo
Dieta	Fase del ciclo menstrual
Componente étnico	Estado del embarazo
Ejercicio	Hora del día cuando se toma la muestra
Estado de ayuno o no ayuno	Uso de tabaco
Localización geográfica	

De: National Committee for Clinical Laboratory Standards: *How to define and determine reference intervals in the clinical laboratory: approved guideline*, NCCLS Document C28-A, Villanova, Penn., 1995, NCCLS.

Table 20-3.

Tabla 20-4. Distribuciones de frecuencias de los niveles de Calcio en 240 estudiantes de
790



medicina, clasificados por sexo.

Compuesto Analizado	Frecuencia		
	Mujeres	Hombres	Combinada
88	1	0	1
89	2•	0	2
91	3	2	5•
91	11	1•	12
92	11	1	12
93	11	8	19
94	8	6	14
95	16	11	27
96	16	12	28
97	26	13	39
98	8	16	24
99	7	14	21
100	3	7	10
101	2	10	12
102	3♦	11	14
103	2	7♦	9♦
104	0	1	1
106	0	1	1
Total	120	120	240

Fuente: National Committee for Clinical Laboratory Standards: *How to define and determine reference intervals in the clinical laboratory: approved guideline*, NCCLS Document C28-A, Villanova, Penn., 1995, NCCLS.

- indica el 2.5^{avo} percentil.
- ♦ Indica el 97.5^{avo} percentil.

Tabla 20-5 Intervalos de confianza del 90% para límites de referencia bajos y del 95% para límites de referencia altos.

Compuesto analizado	Límite de referencia bajo	Límite de referencia alto
Calcio mg/L		
mujeres (n=120)	88 - 91	101 - 103
hombres(n=120)	91 - 93	103 - 106
combinada(n=240)	88 - 91	103 - 106

De: National Committee for Clinical Laboratory Standards: *How to define and determine reference intervals in the clinical laboratory: approved guideline*, NCCLS Document C28-A, Villanova, Penn., 1995, NCCLS.



Tabla 20-6 Propósito para el cual se ordenan análisis de laboratorio y el grado de importancia de los intervalos de referencia en la interpretación de sus resultados

Propósito	Intervalos de Referencia
Diagnóstico de la enfermedad	++
Tamizaje de la enfermedad	+++
Determinación de la severidad de la enfermedad	+
Monitoreo y progreso de una enfermedad	+
Respuesta al monitoreo de la terapia	+
Monitoreo de la terapia	+++
Monitoreo de la toxicidad a fármacos	++
Predicción de la respuesta a un tratamiento	+
Predicción del pronóstico	+
Tranquilidad del paciente	++

De: Young D.S. *Arch Pathol Lab Med* 116:704-709,1.992
+, menor importancia; ++, moderada importancia; +++, mucha importancia.

Tabla 20-7. Sensibilidad, especificidad y valores predictivos *

	Número de sujetos con un resultado Positivo	Número de sujetos con un resultado Negativo	Total
Número de sujetos con enfermedad	VP	FN	VP+FN
Número de sujetos sin enfermedad	FP	VN	FP+VN
Total	VP+FP	FN+VN	VP+FP+FN+VN

VP, Verdaderos positivos, o número de pacientes enfermos correctamente clasificados por la prueba
FP, Falsos positivos, o número de pacientes sanos incorrectamente clasificados por la prueba.
FN, Falsos negativos, o número de pacientes enfermos clasificados incorrectamente por la prueba.
VN, Verdaderos negativos, o número de pacientes sanos correctamente clasificados por la prueba.

Sensibilidad diagnóstica: $VP / VP+FN$
Especificidad diagnóstica: $VN / FP+VN$
Valor predictivo positivo de una prueba, $VP+ = VP / VP + FP$
Valor predictivo negativo de una prueba, $VP- = VN / VN + FN$
Eficiencia de una prueba (fracción de Pacientes correctamente clasificados), $VP + VN / VP+FP+VN+FN$
Prevalencia, $VP + FN / VP+FP+VN+FN$

*De Statland BE, Winkel P, Burke DM, Galen RS. Quantitative approaches used in evaluating measurements and other clinical data, in Henry JB. editor. *Clinical diagnostics and management by*

laboratory methods. Philadelphia, 1979, Saunders.

Figuras

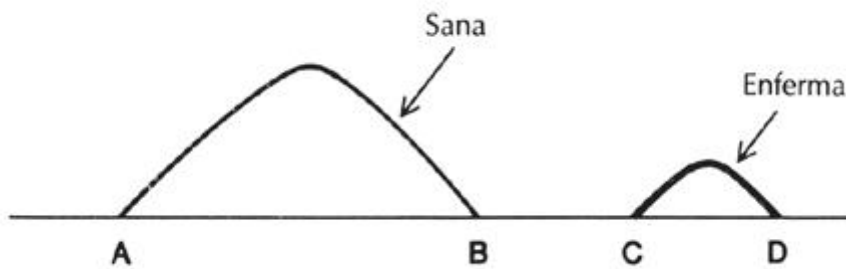


Figura 20-1 Distribución de ensayos perfectamente separados de poblaciones de individuos sanos y enfermos. Esta clara separación rara vez ocurre en la realidad.

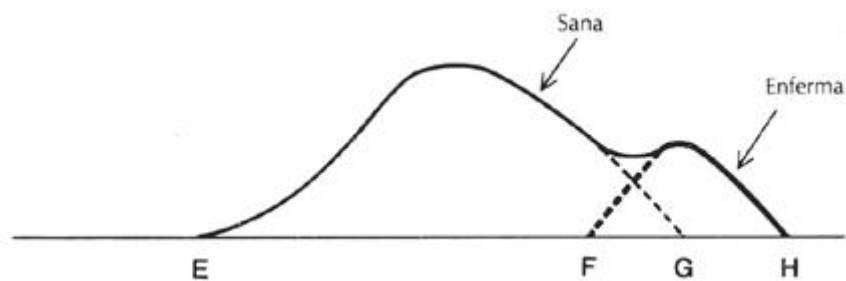


Figura 20-2 Distribuciones de resultados de pruebas obtenidas usualmente de poblaciones sanas y enfermas, entre las cuales ocurre determinada superposición.

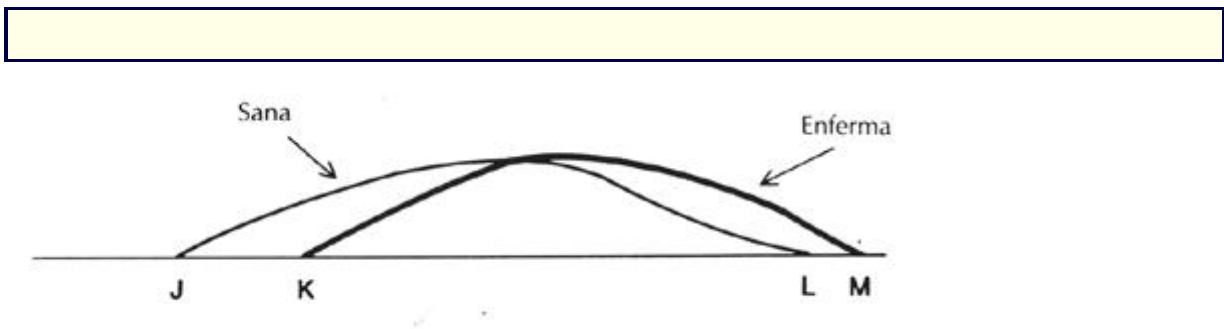


Figura 20-3 El grado de superposición de resultados de pruebas no permite la diferenciación entre las poblaciones enfermas y las sanas.

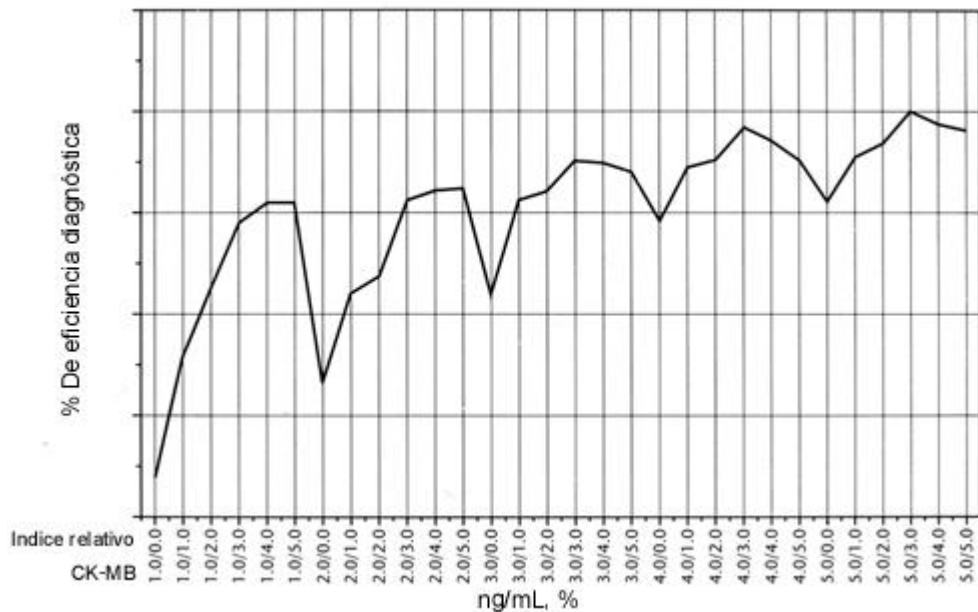


Figura 20-4 Porcentaje de eficiencia diagnóstica contra los niveles de punto de corte combinados de CC-MB en nanogramos por mililitro (conjunto inferior de valores en el eje x) e índice relativo porcentual, expresado como $(\text{CC-MB}/\text{CC total}) \times 100$. La combinación de estas dos pruebas a diferentes niveles de punto de corte respectivos produjo la eficiencia diagnóstica más alta, 90%, en un punto corte de 5 ng/mL para CC-MB y 3% para el índice relativo. (Cortesía de D. Obzansky, Du Pont Cp., Wilmington, Del.)

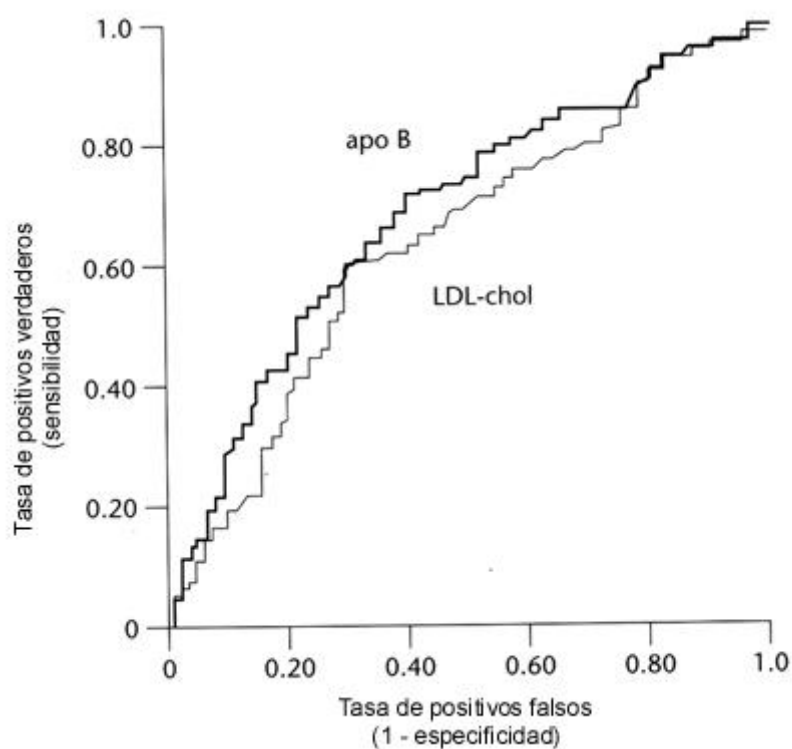


Figura 20-5 Curvas características receptor-operador (CRO) que muestran la discriminación entre sujetos con y sin ninguna enfermedad arterial coronaria, determinada por cateterización cardíaca para dos diferentes indicadores bioquímicos. (De Zweig MH, Broste sK, Reinhart RA: *Clin Chem* 38:1425-1428, 1992.)

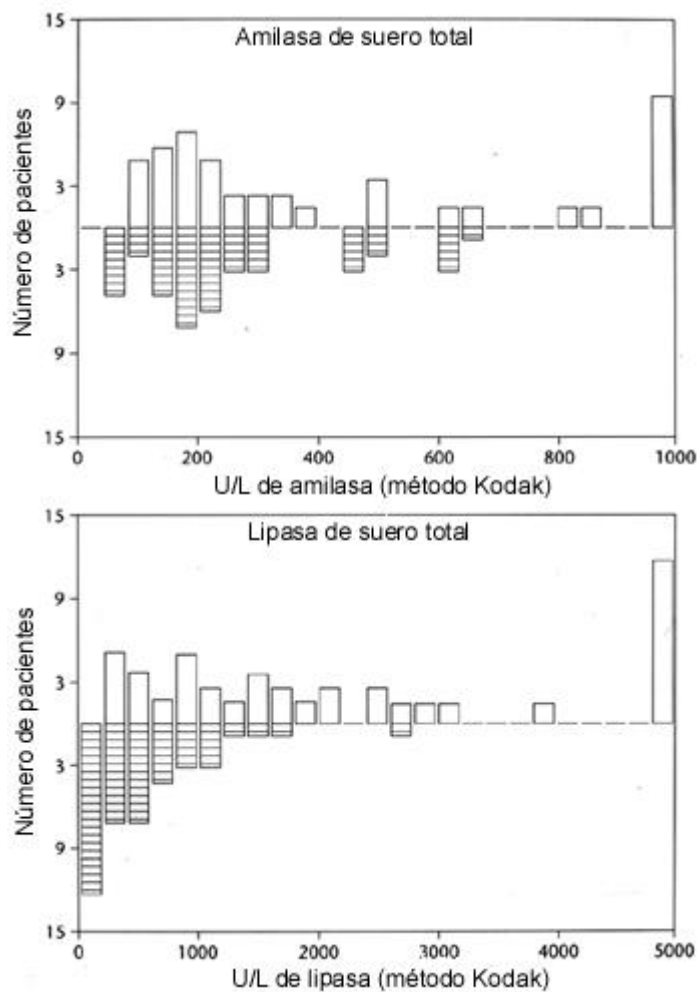


Figura 20-6 Gráficas de Gerhardt modificadas para amilasa sérica, lipasa, y para el diagnóstico de pancreatitis aguda. (De: Gerhardt W: The Bayes approach: sistematic graphic evaluation of diagnostic tests. In Keller H Trendelenburg CH, editors: *Data presentation, interpretation*, New York, 1989, Walter de Gruyter.)

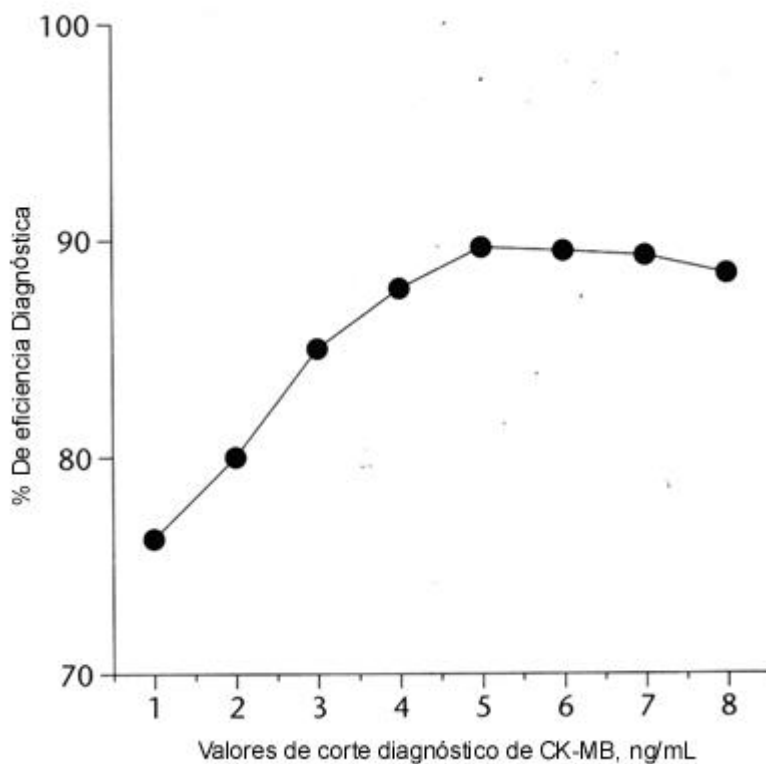


Figura 20-7 Porcentaje de eficiencia diagnóstica graficada contra diferentes niveles de punto de corte diagnóstico en nanogramos por mililitro para un ensayo inmunoquímico hipotético de CC-MB sérica. El nivel de decisión óptimo es la eficiencia diagnóstica más alta, 90%, al nivel de corte más bajo, 5 ng/mL de CC-MB. (Cortesía de D. Obzansky, Du Pont Cp., Wilmington, Del.)

CAPÍTULO 21

21. Control de la Calidad en el Laboratorio Clínico

Richard B. Passey

Especiales agradecimientos a **Bradley E. Copeland, M.D.**, por la autoría de este capítulo en la edición anterior, del cual se mantiene la mayor parte.

Objetivos de un programa de control de la calidad.

Establecimiento de objetivos.

Error total permisible.

Desempeño requerido en los ensayos de aptitud.

Limites de decisión clínicos.

Definición de los criterios de utilidad clínica, mediante el cálculo del límite de cambio significativo.



Control de la calidad, (control del proceso) y detección del error.

Niveles de responsabilidad en el proceso de control.

Análisis de los especímenes de control de la calidad –Toma de decisiones diarias.

Procedimiento para el control de la calidad.

Consideraciones preliminares, en la definición de límites para las mezclas de control de calidad.

Un método simple para establecer valores objetivo promedio, provisionales para las mezclas de control de calidad.

Cálculo de la desviación estándar usual.

Establecimiento de los límites de acción y control para cada nivel de las mezclas de control calidad.

Definición de los límites de control de la calidad mediante curvas de poder.

Detección y solución de problemas de calidad.

La decisión “fuera de control”.

Detección de problemas de calidad.

Utilización de los datos de los pacientes en la toma de decisiones.

Acciones para volver a tener un sistema analítico bajo control.

Medidas a tomar cuando un método está fuera de control.

Procedimientos a seguir cuando un sistema analítico falla.

Calibración y control de la calidad.

Uso de calibradores.

Un sistema práctico para la verificación de un nuevo calibrador.

Control de la calidad durante el cambio de reactivos y el mantenimiento de equipos.

Programas de control de la calidad externo y otras herramientas para el control de exactitud.

Control de exactitud requerido por la CLIA '88

Métodos definitivos y de referencia.

Materiales de referencia.

Selección de un laboratorio de referencia como apoyo en el control de la exactitud.

Responsabilidad de los fabricantes en el control de los sistemas analíticos.

OBJETIVOS

- ♦ Proporcionar un enfoque práctico sobre el control de la calidad.
- ♦ Establecer un sistema de evaluación de las especificaciones de desempeño, durante el proceso de control de la calidad.
- ♦ Proveer métodos prácticos para llevar a cabo el control de la calidad.
- ♦ Desarrollar criterios objetivos en la definición de las condiciones de “fuera de control”.
- ♦ Suministrar una guía conveniente en la solución de situaciones “ fuera de control”.

Términos Claves

CLIA o CLIA '88 La Reforma para el Mejoramiento de los Laboratorios Clínicos



(CLIA '88 por sus siglas en inglés), reglamenta el funcionamiento de los laboratorios clínicos en los Estados Unidos. Esta ley se interpreta mediante regulaciones administrativas desarrolladas por organizaciones certificadoras.

control de la calidad externo Programa en el cual una institución externa provee muestras desconocidas para su análisis. (Vea: Survey o proficiency testing specimen. Encuesta o especímenes para ensayos de aptitud).

Los resultados son remitidos a los laboratorios participantes con una evaluación de rendimiento: “aceptable o no aceptable”. En el CLIA '88 este proceso se conoce con el nombre de ensayos de aptitud.

control de calidad la interno Programa analítico que verifica la aceptabilidad y estabilidad de los resultados del laboratorio, mediante la utilización de muestras controles.

corrida “Una corrida es un intervalo menor de 24 horas, dentro del cual se espera, que la exactitud y precisión de un sistema de análisis permanezcan estables. “(CLIA '88 §493.1218[b]).

curvas de poder Gráfica de la magnitud del error detectado por un sistema de control, versus la probabilidad de detectar el mismo error con reglas de control diferentes.

desviación estándar usual (DEU) Es el promedio de los valores de las desviaciones estándar de 3 a 6 meses, basados en datos consecutivos de control de calidad. Es un estimado de la precisión, que un sistema analítico es capaz de alcanzar.

desviación estándar (DE): Es un indicador descriptivo de la extensión de la dispersión de una población de resultados de ensayos o de un conjunto de datos.

desviación estándar mensual Desviación estándar calculada con los valores de control de la calidad diarios durante un mes.

diferencia significativa Aquella que se demuestra estadísticamente que está más allá del límite de variabilidad esperado; clínicamente es una diferencia suficientemente grande para influir en una decisión médica; operacionalmente es una diferencia estadísticamente significativa que el personal que realiza el ensayo y los supervisores consideran suficientemente grande para requerir una investigación.

ensayos de aptitud ('proficiency testing' en inglés) Estos ensayos son equivalentes a los que se ejecutan en un programa de control externo de la calidad, pero con fines legales para el funcionamiento del laboratorio.

error presupuestado Error total aceptable de un sistema analítico, que está determinado por cada laboratorio sobre la base de los requerimientos médicos o los sistemas reguladores. Este error tolerable producido, debe comprende todas las fuentes del mismo, incluyendo la imprecisión, el sesgo, las interferencias y otros.

especificaciones de desempeño Límites numéricos establecidos por cada laboratorio, para definir el funcionamiento aceptable de cada compuesto analizado y sistema de análisis. Las especificaciones de desempeño, incluyen recomendaciones sobre: exactitud, precisión, sensibilidad, (cantidad mínima reportable), especificidad analítica (sustancias interferentes)



si es aplicable, los límites reportables de los resultados de los pacientes, y el intervalo de referencia o valores normales.

especimen de las encuestas o ensayos de aptitud Muestra que es preparada por una agencia independiente y remitida a los laboratorios participantes de un programa de control externo.

estándar primario Substancias químicas de la más alta pureza conocida, que pueden ser usadas para producir calibradores para sistemas analíticos.

fuera de control Condición en la cual un sistema de análisis es rechazado para ser utilizado en la atención de los pacientes, debido a los resultados de control de la calidad o a otros indicadores. Esta circunstancia debe ser declarada formalmente por el director del laboratorio o por el supervisor técnico, porque la decisión implica la necesidad de tomar acciones específicas de acuerdo con regulaciones del CLIA '88 (Ver §493.1219 Remedial Actions y §493 Quality Assurance Of Quality Controls). Los resultados rutinarios de control de la calidad que excedan los límites definidos, deben ser documentados. (ver *límites de acción*).

grupo semejante Cuando se utiliza en programas de control externo, indica el grupo de laboratorios que utilizan métodos iguales o similares.

límites de acción Rangos de valores establecidos para las mezclas de control de calidad. Si los resultados están por fuera de estos límites puede existir un deterioro en la calidad de los sistemas analíticos, que debe ser investigado por el técnico.

límites de control Límites numéricos, (expresados en las unidades de los ensayos), dentro de los cuales deben hallarse los valores de una muestra de control, para que el ensayo pueda ser considerado válido o dentro de control.

materiales de referencia certificados (MRC). Un material de referencia, que tiene uno o más de sus valores garantizados por un procedimiento válido. Está acompañado o respaldado por un documento expedido por un organismo certificador.^{ref(369)} El material tiene una alta pureza del componente especificado. Los materiales de referencia certificados son usados en la preparación de calibradores o especímenes de concentración conocida.

método El principio metodológico usado en la elaboración de un ensayo: el fundamento químico o físico del mismo.

método de referencia Un método investigado profundamente, en el cual se da una descripción precisa y clara de los procedimientos y condiciones necesarias para la determinación exacta de uno o más valores. La exactitud y precisión documentadas para el método se corresponden con la utilización del método para evaluar la exactitud de otros métodos, para medir valores de la misma propiedad, o para asignar valores a materiales de referencia.

método definitivo El método analítico que ha sido sometido a la investigación y evaluación de todas las fuentes de inexactitud incluyendo la inespecificidad. La magnitud de la imprecisión final del método y el sesgo, expresados en la declaración de incertidumbre, son compatibles con el propósito e implementación final del mismo. El valor final de un método definitivo es



tomado como “valor verdadero”.

mezclas para control de la calidad Cantidad de material estable, (tal como suero, plasma u orina), que es utilizado en un programa de control de la calidad interno para evaluar la aceptabilidad y estabilidad de un sistema de análisis.

procedimiento Grupo de instrucciones para utilizar un método, que genera un resultado analítico.

programa regional de control de la calidad Grupo de laboratorios que adquieren en forma conjunta una gran cantidad de material de control de calidad, con el fin de establecer valores asignados comparables.

promedio mensual Valor promedio para un período de un mes, de los datos de control de la calidad diarios.

promedio mensual Valor promedio para un período de un mes, de los datos de control de calidad diarios.

rechazo falso Rechazo de una serie porque los resultados de control de la calidad indican un problema analítico que no está realmente presente.

rechazo verdadero Rechazo de una corrida analítica porque los especímenes de control indican que existe un problema real.

salto Un salto es un cambio abrupto y sustancial (en una dirección) de los datos de calidad. Un salto generalmente indica un problema en el sistema analítico o en el material de control.

sesgo sistemático El sesgo sistemático puede ser constante o proporcional.

El *sesgo sistemático constante* muestra una diferencia constante entre el valor verdadero y el valor observado, con independencia del nivel de concentración.

El *sesgo sistemático proporcional* denota una diferencia entre el valor verdadero y el valor observado, el cual varía proporcionalmente a medida que cambia el nivel de concentración.

sistema analítico La combinación de un método analítico, un procedimiento para usar el método, reactivos, calibradores, accesorios y un instrumento.

tendencia Cambio gradual en los resultados de las muestras de control de la calidad, que sugiere un problema con el sistema analítico o con el material de control.

valor asignado Es el valor medio, establecido para un compuesto analizado en una mezcla de control de calidad.

variabilidad inherente Los valores de las mediciones repetidas de un mismo material varían alrededor de una media. La desviación estándar mide la magnitud de esta variabilidad.

Esta discusión sobre control de calidad, tal como se realiza en el laboratorio clínico, pretende suministrar una guía útil, para el establecimiento y mantenimiento de la calidad en el trabajo del laboratorio. Breitenberg 4 identificó 10 puntos de las normas para el aseguramiento de la calidad, de la Organización Internacional para la Estandarización, series ISO 9000, que son comunes a todos los sistemas de control. Estos puntos incluyen la garantía y disponibilidad de: (1) Un sistema de calidad efectivo; (2) Mediciones válidas; (3) Equipos calibrados y probados; (4) Técnicas estadísticas apropiadas; (5) Sistemas de identificación y

trazabilidad del producto; (6) Un buen mantenimiento de los procesos de archivo y registro; (7) Sistemas adecuados de control de los registros; (8) Un sistema de inspección y ensayo; (9) Procedimientos para el manejo de las no conformidades; (10) Personal debidamente entrenado y con la experiencia necesaria. El objetivo de los programas de control de calidad debe ser cumplir con cada uno de estos 10 estándares. Un análisis cuidadoso de las normas definidas por la “Reforma para el Mejoramiento de los Laboratorios Clínicos de 1988” (CLIA 1988), muestra que todos los puntos mencionados anteriormente deben incluirse en un sistema de control de la calidad de laboratorio.

Los principales objetivos analíticos de un programa de control de calidad para un laboratorio clínico deben ser:

1. Establecer y mantener métodos exactos.
2. Definir y mantener los valores de precisión necesarios para el laboratorio.
3. Garantizar que los sistemas analíticos sean estables y que funcionan de acuerdo con las especificaciones de manejo. Esto incrementa la confiabilidad de las decisiones médicas a corto y largo plazo.

Para alcanzar estas metas, se debe cumplir con los 10 objetivos de aseguramiento de la calidad enumerados anteriormente, establecer políticas para la preparación y atención del paciente, reducir los errores pre-analíticos (ver capítulo 3), y maximizar el uso efectivo del personal y las instalaciones del laboratorio. Un programa de control de la calidad, está diseñado para evaluar qué tan bien se cumplen estos objetivos.

Objetivos de un Programa de Control de Calidad

Establecimiento de objetivos

El primer paso cuando se está implementando un programa de control de calidad para el laboratorio, es definir los criterios de desempeño aceptables. ¿Qué exactitud y precisión *serían* recomendables? ¿Qué tan exacto y preciso *debe* ser? Estas consideraciones incluyen la definición del error analítico permisible, basados en la utilización de los resultados de las pruebas.^{refs(370)} Un control más allá del requerido para fines clínicos puede ser una pérdida de tiempo y de materiales, por lo que resulta importante evaluar si la reducción del error mejora el diagnóstico, tratamiento o pronóstico del médico.

Los criterios de desempeño pueden ser formulados de acuerdo con diferentes bases. La primera está constituida por los estándares reguladores. Por ejemplo, la precisión y exactitud requeridas por CLIA '88. La segunda es la precisión y exactitud alcanzables en su funcionamiento por la mayoría de los laboratorios. Esta información puede obtenerse mediante comunicación con profesionales de otros laboratorios, o por los resultados de los programas de control externo como el del Colegio de Patólogos Americanos (CAP). Tercero y probablemente lo más importante, es esencial definir la precisión y exactitud requeridos por el personal médico, quienes son los usuarios de los resultados producidos por el laboratorio. El error de los sistemas analíticos, debe ser mucho menor que el valor aceptable por las normas reguladoras, porque si no es así, el laboratorio no podrá cumplir con estas reglamentaciones y quizás tampoco con los requerimientos médicos. La siguiente sección



revisará los criterios clínicos que son utilizados para establecer y evaluar el desempeño del laboratorio.

Error total permisible

El error total permisible de un sistema de análisis, está compuesto de varios elementos y cada uno de ellos, puede ser una fuente de imprecisión o de sesgo. Si el error total puede ser comparable con el error presupuestado, la suma de los componentes individuales del error aceptable, constituye el error total producido de ese presupuesto. Cuando éste se excede, es porque se ha superado el error que puede ser tolerado en un ensayo de laboratorio. Cuanto mejor se puedan identificar los componentes del error, mejor se podrán ajustar los elementos del ensayo para reducirlo. Los requerimientos médicos y del CLIA '88, no dependen de que el error se introduzca por imprecisión o por sesgo del resultado; es la combinación de ambos que determina el error total. Sin embargo, el personal del laboratorio debe conocer qué partes representan la imprecisión y el sesgo existentes en el error total producido, porque el procesos de solución de estos problemas son frecuentemente diferentes.

El error total [ref\(371\)](#) está definido por la imprecisión y el sesgo mediante la fórmula:

$$\text{Error total} = \text{Suma de los errores de sesgo} + 1.96 \times \text{DE (Desviación estándar)} \quad \text{Ec. 21.1}$$

Se debe tener en cuenta que 1.96 es el límite de confianza (frecuentemente redondeado a 2 por conveniencia) para un grupo de resultados con una distribución normal.

Ejemplo: Si los requerimientos médicos para glucosa, definen que el error total debe ser menor que 60 mg/L a una concentración de 1200 mg/L, y usted sabe que su imprecisión es de 20 mg/L, el máximo sesgo que su método puede tener, se calcula de la siguiente manera:

$$\begin{aligned} 60 \text{ mg/L} &= x \text{ mg/L} + 1.96 \cdot 20 \text{ mg/L} \\ \text{Máximo sesgo} = X &= 60 - (1.96 \cdot 20) = 20,8 \text{ mg/L} \end{aligned}$$

Un sesgo en el ensayo demasiado grande, se puede reducir con frecuencia, empleando procedimientos de calibración y materiales más exactos. La imprecisión se incrementa por componentes electrónicos y mecánicos de baja calidad. El estado de mantenimiento de los instrumentos, puede afectar el sesgo y la imprecisión. Un sistema de control de calidad exacto, puede proveer información de ambos, exactitud y precisión.

La Tabla 21-2 contiene datos analíticos del Centro Médico de Oklahoma, en donde se muestra el error total para una serie de pruebas. El error total es grande, porque incluye el sesgo aportado por varios instrumentos utilizados al procesar y reportar las pruebas. El error de exactitud presupuestado, debe incluir el sesgo introducido por la utilización de diferentes sistemas analíticos, ya que el problema de la desviación entre ellos es de tal magnitud, que puede afectar la utilización médica de las pruebas, y generalmente éstas se realizan utilizando más de un sistema.

Desempeño requerido en los programas de control externo.

El gobierno federal ha presentado los criterios de error permitidos para 154 pruebas en 13 áreas del laboratorio además de citología. (Reglas para los ensayos de aptitud del CLIA '88, *Federal Register* Febrero 28, 1990, páginas 7152-7162). Los criterios de CLIA para Química



Clinica están enumerados en la Tabla 21-2. Estos criterios de error permisibles, definen la cantidad de error total que el resultado de una prueba de un ensayo de aptitud puede tener. El valor diana, también denominado valor objetivo o valor blanco, utilizado para determinar el sesgo es definido por el servicio que brinda el ensayo de aptitud usando la media general, o la media del grupo par, o el valor establecido mediante un método definitivo o de referencia. Las ventanas de error de CLIA '88 (presupuestas) son demasiado grandes para los límites del control de la calidad rutinario ya que los errores de imprecisión de esta magnitud causarán fallos en los ensayos de aptitud.[ref\(372\)](#)

Compare los errores totales presentados en la Tabla 21-1 con el los errores clínicos permisibles y las máximas ventanas de error especificadas por CLIA '88. Observe que varias pruebas en la Tabla 21-2 presentan problemas potenciales con los ensayos de aptitud, debido a un error total alto e inaceptable, cuando se procesan las pruebas por más sistemas de análisis. Este sería el caso si los ensayos de aptitud imitaran realmente el trabajo del laboratorio. Sin embargo, en la práctica actual, estos ensayos de aptitud únicamente comparan los resultados con los grupos objetivos o similares por instrumentos.

Límites de decisión clínicos.

Para tener un verdadero control de calidad es necesario evaluar, desde la perspectiva de los clientes, el desempeño requerido en cada paso de la operación del laboratorio.[refs\(373\)](#) Un buen programa de control de la calidad incluye entre sus fundamentos, el establecimiento de criterios de desempeño analítico de exactitud y precisión, basados en los requerimientos de utilidad clínica.[refs\(374\)](#)

En la Tabla 21-1 se compara el error analítico total para diferentes instrumentos con el error permisible sugerido por los requerimientos médicos y el exigido como aceptable por el CLIA '88. Un ejemplo de criterios clínicamente definidos para precisión y exactitud son las guías formuladas por El Instituto Nacional de Salud ("National Institute of Health" o "NIH", por sus siglas en inglés) para el análisis de colesterol.[refs\(375\)](#) Para minimizar el error en el diagnóstico de las hiperlipidemias, el NIH estableció un valor de 3% como límite de imprecisión y 3% como un grado aceptable de sesgo (inexactitud). Cada laboratorio debe consultar a los usuarios apropiados o a los médicos para obtener su estimado de error permisible basado en la práctica clínica.[refs\(376\)](#) Si sus requerimientos son razonables y no ponen en conflicto el laboratorio con los requerimientos oficiales se podría tratar de tomar estos límites de error. Si no hay información disponible acerca de las necesidades de precisión y exactitud para las decisiones médicas, el laboratorio podrá estimar su error teórico basado en el grado de variación inter e intraindividual para cada compuesto analizado.[refs\(377\)](#) En la pág. 405 se presentan las ecuaciones relativas al error total permisible de acuerdo con estas variaciones biológicas. La Tabla 3-1 relaciona algunos ejemplos de variabilidad intraindividual para ciertos compuestos analizados. Una vez se haya decidido el criterio de error total permisible de acuerdo con los requerimientos médicos, los métodos y sistemas analíticos deben estar en capacidad de producir valores que satisfagan estos requerimientos.

Adicionalmente, el control de la calidad debe estar diseñado para garantizar que los sistemas analíticos mantienen estos límites. Los intervalos de referencia de las pruebas describen los valores esperados para grupos de individuos seleccionados cuidadosamente, determinados mediante sistemas analíticos que se asume tienen un desempeño apropiado. (Ver capítulo 20). Un incremento en el sesgo ocasionará un cambio en los valores de los ensayos que invalidará



la utilidad clínica de los rangos de referencia establecidos.

Definición de los criterios de utilización médica mediante el cálculo del límite de cambio significativo

La utilidad clínica de los ensayos de laboratorio, depende de la capacidad de mantener día a día la precisión y exactitud de los sistemas analíticos. Los médicos toman muchas decisiones, sobre la base de las diferencias de los valores de los resultados que diariamente tienen los pacientes, asumiendo que se ha mantenido el mismo nivel de precisión y exactitud, de día a día, mes a mes o año en año. Así, la precisión y exactitud actuales de los procedimientos de medición, influyen directamente la interpretación clínica de los cambios diarios de los resultados de laboratorio. Un elemento clave en la evaluación de la utilidad médica de un resultado de un ensayo, es el estimado de la magnitud de cambio analítico significativo en la concentración. Este estimado es llamado el *límite de cambio significativo* (LCS).

El límite de cambio significativo, es una herramienta de decisión que ayuda a los médicos a saber, si los cambios que se producen día a día en los resultados de laboratorio, son debidos a la variabilidad inherente a los procesos analíticos, o a los cambios causados por modificaciones en la fisiología y patología del paciente. El límite de cambio significativo asume que la desviación estándar usual, representa la variabilidad analítica del método. La desviación estándar teórica de la diferencia (DE_{dif}) entre dos análisis del mismo material en diferentes días, está relacionada con la desviación estándar usual (DEU) del procedimiento por la siguiente fórmula:

$$SD_{dif} = \sqrt{2(USD)^2} = 1.4 \text{ USD} \quad \text{Ec. 21-2}$$

El LCS representa entonces, el 95% de los límites de confianza ($\pm 2 DE_{dif}$) y definen la magnitud de la variabilidad inherente al método:

$$LCS = \text{Valor promedio} \pm 2 DE_{dif} = \text{Valor promedio} \pm 2.8 \text{ DEU} \quad \text{Ec. 21-3}$$

Como una aproximación, el límite de cambio significativo es tres veces la desviación estándar usual (Tabla 21-3). Valores mayores que el cambio del límite significativo podrían representar una alteración real en el estado del paciente. Por ejemplo, si la desviación estándar usual para colesterol es de 50 mg/L, el cambio del límite significativo es 2.8 veces 50, o sea 140 mg/L. Una variación de 2000 o 2200 mg/L, excedería el LCS y representaría un cambio real en el estado del paciente. Un cambio de 2000 a 1900 mg/L, no excedería el LCS y podría ser el resultado de la imprecisión del método. Para facilitar que la toma de decisiones por parte del médico sea acertada, es necesario mantener unos niveles consistentes de precisión de mes a mes y de año en año.

Control de Calidad (Proceso de Control) y Detección de Errores



Una vez que han establecido los criterios de desempeño, se debe implementar un sistema de control de los procesos, que permita vigilar constantemente el ensayo (incluyendo las fases preanalíticas y postanalíticas), para asegurar que se cumplan los objetivos de funcionamiento, o tomar las medidas necesarias para alcanzarlos. Es importante reconocer el papel del personal del laboratorio, como el corazón del proceso de control de calidad.

Niveles de responsabilidad en el proceso de control.

El proceso de control, que nosotros llamamos control de calidad (CC) está diseñado para detectar el error en los sistemas analíticos. Existen al menos tres niveles en este proceso, cada uno es responsabilidad de diferentes personas. Para que el proceso de control sea más efectivo, es esencial tener una activa comunicación entre los individuos de los diferentes niveles.

El primer nivel, es responsabilidad del equipo de técnicos y de los supervisores. El proceso de control en este nivel, incluye los análisis diarios de los especímenes de control discutido en esta sección y la revisión de los resultados y de los reportes de los pacientes. El técnico es responsable de efectuar análisis de especímenes de control en intervalos apropiados, y determinar que no existen errores sistemáticos aparentes en ninguna de las series realizadas. Ambos, el técnico y el supervisor son responsables de revisar los datos de los pacientes para garantizar que no existe un error aleatorio.

El segundo nivel de control de la calidad asegura que durante un período relativamente corto de semanas a meses, únicamente se produzca un sesgo mínimo en el sistema. La responsabilidad del control aquí está usualmente compartida por el supervisor y el director de laboratorio, aunque los técnicos con frecuencia contribuyen grandemente. El proceso de control en este nivel, requiere la revisión de los datos de control de calidad y de los ensayos de aptitud que se han acumulado durante ese período de tiempo.

El tercer nivel de los procesos de control asegura que los sistemas analíticos son tan precisos y exactos como sea posible. Esta responsabilidad recae sobre el director de laboratorio o el asesor técnico. El control de este proceso requiere: la revisión de los resultados de los ensayos de aptitud, el conocimiento de los niveles de precisión y exactitud alcanzables por otros laboratorios, y cuando sea aplicable la utilización de estándares para exactitud para verificar o corregir de errores. La revisión de control de calidad en este nivel debe hacerse durante un período largo de tiempo, de meses a años. La discusión de los ensayos de aptitud se encuentra en una sección posterior.

El control de calidad del sistema analítico total, desde la toma de muestras hasta la impresión del reporte del paciente, requiere mediciones de control adicionales, que evalúan en muchos casos, el cumplimiento de la reglamentación oficial sobre cada uno de los pasos del proceso, los cuales se revisan en el Capítulo 2. Un factor importante que pocas veces es formalmente reconocido, son las quejas de los médicos sobre los problemas percibidos, que son ocasionados con frecuencia por deficiencias reales de una parte del sistema analítico. Estos errores pueden no ser conocidos por el laboratorio, hasta que son revelados mediante la investigación de una queja por el personal del laboratorio. Dar seguimiento y solucionar las quejas de los médicos, es entonces un factor muy importante, que ayuda al control de calidad sobre todo el sistema analítico.

Análisis de los especímenes de control de calidad: Toma de decisiones diaria.



La preparación y análisis diarios de las “mezclas” de control de calidad es una responsabilidad rutinaria del técnico, quien las procesa como controles “conocidos”, simultáneamente con las muestras de los pacientes. Los valores son “conocidos” porque se han realizado ensayos para determinar los niveles reales de cada constituyente. El laboratorio puede estimar estos valores diana de las muestras de control mediante: análisis repetidos, a través de la utilización los rangos de valores asignados por los fabricantes, o de forma ideal, determinarlos por métodos definitivos o de referencia (ver más adelante, pág. 399). La frecuencia de los análisis de los materiales para *control de la calidad* se establece para cada método por cada laboratorio. La CLIA '88 recomienda analizar, por lo menos, 2 controles de diferentes valores para cada serie (definida ésta sólo hasta 24 horas de operación estable).

La mayoría de los laboratorios utiliza dos tipos de “mezclas”, uno normal y otra anormal. La primera contiene sustancias a analizar en concentraciones dentro del intervalo de referencia no patológico, mientras que una “mezcla” anormal contiene los compuestos analizados en concentraciones por fuera del mismo. Algunos laboratorios utilizan hasta tres “mezclas” - anormal bajo, normal y anormal alto-especialmente cuando se toman decisiones clínicas en cada nivel. La CLIA le permite a cada laboratorio fijar sus propios protocolos para el control de las pruebas de química, siempre y cuando se procesen al menos dos muestras de control de diferentes concentraciones cada 24 horas. Algunos estados exigen tres “mezclas” para algunas pruebas. Para el análisis de gases arteriales, la CLIA requiere como regla especial mínima, procesar una muestra de CC cada 8 horas de trabajo y el uso de una combinación de muestras de CC y calibradores, la cual incluya todos los días especímenes de concentraciones bajas y altas. CLIA '88 también exige el uso de un calibrador o un control cada vez que se procese la muestra de un paciente, a menos que el instrumento de gases sea calibrado cada 30 minutos (§493.1243). Normalmente el fabricante de un sistema analítico recomienda la frecuencia de análisis que debería ser usada como base en la reglamentación del sistema de control de calidad del laboratorio.

El personal que realiza las pruebas tiene que revisar cada uno de los valores de control de calidad, para poder tomar una decisión sobre la validez de los resultados del paciente. Generalmente, si las muestras de control de calidad están dentro del rango aceptable, se asumirá que los datos de los pacientes obtenidos en la misma serie son válidos y se pueden “aceptar”. Al contrario, si los resultados para esta “mezcla” de control de calidad son inaceptables, la serie se rechazará (ver pág. 391). La decisión de aceptar o rechazar la serie analítica debe ser documentada con la anotación “aceptada o “rechazada”, el nombre del analista (o número de código) y la fecha, en el registro de trabajo diario, en un cuaderno separado, en un registro de datos, o bien en el sistema de información del laboratorio, SIL (ver capítulo 18). Usualmente, el técnico es responsable del proceso de verificación y aceptación de datos en el SIL.

Los ensayos diarios del sistema básico de control de calidad, tienen mayor utilidad para detectar errores sistemáticos o un incremento de la imprecisión. También se pueden utilizar para detectar un incremento de la imprecisión. Sin embargo, los errores al azar, que ocurren de forma impredecible, generalmente no son detectados por el sistema de control de la calidad. Estos son detectados únicamente, mediante la revisión de los problemas reportados y de los resultados de los pacientes (ver págs. 394 – 396).

Procedimiento para el control de calidad.



Cómo elegir una “mezcla” de control de calidad.

El material para control de calidad debe tener una matriz que sea casi igual a la de las muestras que se van a procesar. Esto significa, que si la serie incluye líquido cefalorraquídeo, suero y orina, los controles deben estar constituidos por estos elementos.

Debido a que el material para control de la calidad, se analizan simultáneamente con cada serie de muestras de pacientes, cada año se necesitan grandes volúmenes de material. Actualmente, el laboratorio puede obtenerlo en suficiente cantidad de varias fuentes: (1) mezcla comercial liofilizada; (2) “mezclas” líquidas comerciales estabilizadas; (3) mezclas de muestras de pacientes congeladas. El suero del paciente es usado con mayor frecuencia que el plasma, por que es más fácil de conseguir y probablemente incluye menos material precipitado. Los líquidos o “mezclas” congeladas y clarificadas (con materiales que reducen la turbidez), muestran desviaciones estándar más pequeñas que las liofilizadas, en parte porque no involucran los errores inherentes a los procesos de liofilización. Sin embargo, estas “mezclas” líquidas experimentan mayores errores de inestabilidad, asociados con el transporte de los lotes a los clientes. La Tabla 21-4 presenta algunas características de las tres fuentes de material de control de calidad. Es importante seleccionar una “mezcla” que tenga una matriz que interfiera lo menos posible con los métodos utilizados en el laboratorio, debido a que algunas características como la turbiedad o ciertos constituyentes químicos, pueden inutilizarlo.

Es importante hacer notar, que el material de control preparado en el laboratorio con muestras de los pacientes (suero, plasma, orina, y LCR), puede estar contaminado con microorganismos peligrosos y por lo tanto es esencial analizar los especímenes de cada lote y la “mezcla” final, para descartar su presencia.

Las siguientes recomendaciones se aplican para todas las muestras utilizadas en la preparación de “mezclas” para control de calidad. Primero, todo el material humano debe ser analizado para descartar la presencia del virus de inmunodeficiencia humano y del virus de Hepatitis B. Ninguna “mezcla” debe ser usada, si existe evidencia de la presencia de cualquiera de ellos. Segundo, todos los materiales de control necesitan espacio en refrigeración o en el congelación para el almacenamiento del material para el consumo de 1 a 2 años. Alternativamente, los distribuidores comerciales pueden suministrar cantidades de un mismo lote en forma mensual o trimestral, durante 1 o 2 años. Esto le permite al laboratorio obtener una estabilidad a largo plazo en los procesos de control de la calidad, aunque de todos modos debe considerarse, la posibilidad de variación de un envío a otro, dentro del mismo lote.

Algunos grupos de profesionales y fabricantes ofrecen participación en programas regionales de control de la calidad, en los cuales los laboratorios utilizan el mismo lote de suero control. Esto ofrece ventajas tanto en costos como científicas. La comparación entre laboratorios puede ayudar a pronosticar cómo va a funcionar el sistema analítico en los ensayos de aptitud. Esta comparación es más valiosa cuando la exactitud de la “mezcla” de control de calidad está establecida por métodos de referencia o métodos definitivos. [refs\(378\)](#)

Consideraciones preliminares en la definición de los límites para las “mezclas” de control de calidad.

A menos que el valor verdadero de una “mezcla” esté establecido por métodos



definitivos o de referencia, los valores asignados son sólo promedios de mediciones repetidas. El promedio transitorio o el promedio final de los valores diana de la mezcla para control de la calidad son las concentraciones estimadas para cada compuesto analizado dentro de la mezcla. Cada laboratorio usualmente establece sus propios valores diana promedio, para cada análisis, ejecutando los procedimientos de laboratorio en cada material de control. CLIA'88, permite que los fabricantes de las "mezclas" establezcan los valores diana, si el laboratorio confirma que éstos son aplicables a sus sistemas de análisis.

Los laboratorios deben resolver un dilema, al considerar los límites diana que resultan de las nuevas reglas de la CLIA. Por un lado, existe la necesidad de optimizar la calibración del sistema analítico de acuerdo con las instrucciones del fabricante, pero por el otro, se presenta la necesidad de cumplir con los requerimientos de los ensayos de aptitud. La Administración Financiera para el Cuidado de la Salud permite a cada proveedor de pruebas de control externo, determinar cómo establece los valores diana que serán utilizados para juzgar si es aceptable el desempeño del laboratorio. Si el valor diana es calculado a partir de las medias de los grupos semejantes para cada sistema analítico, es mejor establecer los valores diana del sistema de CC del laboratorio, utilizando las recomendaciones del fabricante para calibración y para CC. Sin embargo, si los valores diana para los ensayos de aptitud son establecidos mediante el cálculo del promedio de todos los participantes o por la determinación del valor verdadero por métodos definitivos, podrían aparecer problemas cuando se optimizan los ensayos de acuerdo con las especificaciones de los fabricantes y se presenta un sesgo como resultado de ellas.

Parte del problema con el establecimiento de un programa de control de la calidad, utilizando las recomendaciones de los fabricantes, es el efecto que la liofilización produce (por cambios de matriz) en varios constituyentes, causando interferencias específicas del método o sesgos (por ejemplo como resultado de la turbiedad de esos especímenes). El dilema, por lo tanto, es que si el laboratorio cumple los requerimientos de CLIA'88 de seguir las instrucciones del fabricante, pueden tener fallas en los ensayos de aptitud. Sin embargo, un laboratorio puede modificar las instrucciones del fabricante, mediante las reglas de CLIA'88, si el laboratorio tiene datos que validen cualquier cambio.

Cuando se establecen nuevos valores diana para un nuevo lote de material de control de calidad, es importante asegurarse de que durante el período de recolección de datos, los sistemas analíticos se están comportando de acuerdo con las especificaciones normales. El nuevo lote de material de control, debe ser probado paralelamente con el lote en uso. Si los datos analíticos del material de control de calidad en uso, indican una ejecución satisfactoria de los métodos, se puede asumir, que los datos para el nuevo lote son válidos. Cuando se establece un sistema de CC por primera vez, la presente metodología se acepta como válida si el método cumple sus especificaciones de desempeño. La selección del método analítico (o sistema analítico) por parte del laboratorio está basada en la experiencia con la utilidad médica, los límites de cambio significativos, el control externo de la calidad y las comparaciones de exactitud, y el desempeño del control de la calidad. Existen básicamente tres vías que pueden ser usadas para establecer los límites de los valores que son aceptables para una mezcla de control. La primera es la utilización del error clínicamente aceptable, la segunda, más usual, es calcular el valor diana y la desviación estándar para el método (DE) y utilizar un número definido de desviaciones estándares para establecer el rango. La tercera técnica es emplear el método de las curvas de poder que es el procedimiento más exacto



estadísticamente. En las siguientes páginas se describirán estas tres alternativas.

Un método simple para establecer los valores diana promedio temporales de las “mezclas” de control de la calidad.

1. Adquirir material de CC para un 1 año de consumo como
2. Es preferible planear con 6 semanas de anticipación antes de cambiar los “mezclas” de control, para permitir *a)* El análisis comparativo entre los lotes de material de control viejo y nuevo (3 semanas), *b)* la reducción de datos, cálculos y evaluación de los límites de control (1 semana), y *c)* 2 semanas de seguridad ya que no toda planeación es perfecta. También es aconsejable conservar 20 o 30 frascos de cada “mezcla” vencida, para ser utilizados en la evaluación de los problemas resultantes de los cambios en el sistema. Identificar claramente la “mezcla” que se vence para asegurar que no es utilizada después de su fecha de vencimiento o que no es confundida con el lote actual de materiales de control. La CLIA prohíbe a los laboratorios el uso de reactivos, soluciones, controles, calibradores o medios de cultivo que se encuentren fuera de la fecha de vencimiento (§493.120[e] [1]). Cualquier excepción tiene que ser concedida específicamente por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA en inglés).
3. Reconstituir cuidadosamente el material liofilizado, siguiendo las indicaciones de la etiqueta. Si se mezcla muy rápido o muy fuerte se puede tener problemas con la solubilización del material liofilizado o desnaturalizar las proteínas constituyentes reduciendo la actividad de las enzimas. En cada frasco de material de control debe registrarse, después de su reconstitución, datos como la fecha, la hora y las iniciales del tecnólogo que efectuó la operación. Si utiliza una “mezcla” líquida congelada, mezcle el especimen seis veces por inversión después de descongelar, debido a que las proteínas y otros componentes se concentran en el fondo del frasco durante la congelación.
4. Analizar diariamente y por duplicado dos frascos diferentes (20 frascos, 40 mediciones) durante 10 días. Un procedimiento alternativo es reconstituir un frasco por día y ejecutar las prueba por duplicado durante 20 días consecutivos (20 frascos, 40 mediciones). Ver la Tabla 21-3 para un ejemplo de este cálculo.
5. Determinar los valores diana temporales para cada constituyente calculando el promedio de esos 40 valores analíticos ($n = 40$). Este valor diana temporal es reemplazado después de dos meses con un valor diana final promedio (ver el siguiente texto).
6. Calcular la desviación estándar de los 40 valores. Note que esta desviación estándar calculada, es un híbrido entre la imprecisión entre series y la imprecisión total, porque las pruebas están realizadas en series individuales y durante diferentes días. Fijar el rango de los valores de control permitidos alrededor de la diana temporal promedio, utilizando la desviación estándar calculada recientemente, multiplicada por el límite de control del laboratorio, expresado como número de desviaciones estándar (como 2.5 o 3.0 2,5 ó 3,0). El número de desviaciones estándar para el rango de control puede ser establecido también de acuerdo con la medida de la DEU y el error permisible para cada prueba (ver el siguiente texto y la Tabla 21-3). Si el error permisible para glucosa a un nivel de 1200 mg/L es de ± 60 mg/L, el rango de control debe ajustarse dentro de estos límites. En otras palabras, el rango completo de control del sistema analítico (para ± 3 desviaciones estándar) debe ajustarse

dentro de los ± 60 mg/L permitidos. Para este ejemplo, una desviación estándar puede ser tan grande como 20 mg/L. Alternativamente, si la desviación estándar usual es 15 mg/L, entonces ± 4 desviaciones estándar pueden ajustarse dentro del rango permitido.

La diana promedio temporal y los rangos de valores de control permisibles se pueden utilizar ahora para rutinas de control de calidad en el laboratorio durante los dos meses siguientes.

7. Después del segundo mes, se tienen tres valores para calcular el valor diana promedio final: el valor diana temporal y dos promedios mensuales (Tabla 21-3). Si el material de control es ligeramente inestable con el tiempo (por ejemplo, la actividad de la fosfatasa alcalina cambia a menudo durante el tiempo), el proceso utilizado para cambiar el valor objetivo, debe incluir evidencias de que el valor del material de control cambió mientras el sistema analítico permaneció constante. Tal evidencia puede ser probada adicionando materiales estables con valores conocidos (tales como un control diferente, excedentes de material de los ensayos de aptitud, o materiales de calibración adicionales). El proceso de decisión para cambiar el valor diana tiene que estar bien documentado. Es preferible evitar el empleo de material de control inestable.

Cálculo de la desviación estándar usual.

Cada método tiene una característica de variabilidad inherente llamada la *desviación estándar usual*. La DEU se calcula, a partir de una serie de tres a seis desviaciones estándar mensuales consecutivas, obtenidas cuando el sistema de análisis está supuestamente estabilizado. La DEU es un estimado válido de la variabilidad entre días de las mediciones individuales. La DEU puede ser utilizada eventualmente en lugar de la DE temporal, para establecer los límites de control diarios, alrededor del valor diana final promedio. La Tabla 21-3 muestra cómo puede ser utilizada la DEU para calcular el número permitido de desviaciones estándar de los controles, manteniendo la utilidad clínica del sistema analítico. El error clínicamente permisible se divide por la DEU para calcular el número de desviaciones estándares usuales existentes dicho error. Este cálculo asume que los sesgos no son significativos. Si los hubiera, se debe sustraer primero el valor de los sesgos del error total clínicamente aceptable y después dividir el resultado por la DEU. Este número calculado de desviaciones estándar deber ser igual o mayor que el número de las desviaciones estándares utilizadas para el rango de control del laboratorio. De otra modo la prueba estará persistentemente fuera de control, o su utilidad médica estará comprometida.

La DEU también puede ser utilizada para establecer la significación estadística de la diferencia entre dos valores del mismo paciente. A esto último se le llama frecuentemente como límite de cambio significativo (ver pág. 387).

Establecimiento de los límites de acción y control para cada nivel de la “mezcla” de control de calidad

Los límites de resultados aceptables son utilizados para determinar los límites de acción del rango de control. Históricamente, un resultado de CC que excedía los límites establecidos era conocido como un valor *fuera de control*. Sin embargo, las regulaciones de la CLIA, ahora definen específicamente el término *fuera de control*, como una situación en la cual un sistema analítico no puede ser utilizado para reportar resultados de pacientes. De este modo, el término *excediendo los límites de acción*, es utilizado ahora, para designar la condición menos



sería en la que el resultado de una rutina de análisis de CC excede los límites fijados. La respuesta documentada de un tecnólogo médico a un resultado de CC que excede los límites de acción (ver texto siguiente), no incluye dejar de utilizar el procedimiento. Esto sólo ocurre cuando el director del laboratorio declara formalmente que el sistema analítico está fuera de control y el laboratorio empieza un proceso formal correctivo para solucionar esta seria situación (ver texto siguiente). Un laboratorio estará mejor preparado, si señala las condiciones que definirán estas dos situaciones en su manual de laboratorio.

Históricamente, los márgenes eran ± 2 desviaciones estándar y cubrían el 95% de los valores de control esperados. Sin embargo, esto significa que se espera que el 5% de los resultados del material de control excedan los límites de acción, aún cuando el método está funcionando perfectamente. Un falso rechazo de una serie resultará en una repetición excesiva de muestras y necesitará elaborar la documentación requerida en esos casos por las regulaciones de la CLIA. Por eso, existen muchas sugerencias para usar otros límites diferentes a ± 2 DE como límites de control. Muchos laboratorios utilizan normalmente 2,5 ó 3,0 desviaciones estándar para los límites aceptables en un intento de reducir el número de series falsamente rechazadas y la pérdida de tiempo en repeticiones innecesarias.

Sin embargo, el uso de 2,5 ó 3,0 desviaciones estándar como límite de error, puede no detectar el error que es aceptable por los requerimientos médicos y por la CLIA, [ref\(379\)](#). De este modo, una segunda propuesta es establecer diariamente los márgenes de control de calidad, basados en las consideraciones anteriormente discutidas. El rango diana tiene que ser igual o menor que el error total permisible (ver pág. 384), el cual a su vez es igual a, o menor que el error clínicamente y legalmente aceptable por la CLIA. Los límites diana de control serán por lo tanto algunos múltiplos de la DEU o de las DE temporales que cumplan con estos requerimientos. El número de múltiplos elegido se basará en la necesidad de detectar casos verdaderos de mediciones inexactas y minimizar falsos rechazos de series aceptables (ver el siguiente texto).

Otra propuesta es la de establecer el rango permisible basado solamente en los criterios de utilidad clínicos. El rango se expresa como más o menos la ventana del error clínicamente permisible alrededor del valor diana. Este proceso no requiere que el laboratorio utilice ± 2 ó más desviaciones estándar. La ventana de control es tan ancha como lo permite el uso médico. Una situación de “límite de acción” se presenta cuando el valor del ensayo del material de control excede los límites de error. Se debe determinar que esta propuesta no coloque al laboratorio en riesgo de falla en los ensayos de aptitud.

Para todas estas propuestas, el rango de control final no tiene que ser tan grande como para que el sistema analítico deje de detectar verdaderos casos de falla del método.

Definición de los límites de control de la calidad mediante curvas de poder

Entre las principales preguntas en control de la calidad están: “¿Qué tantas pruebas de control de la calidad son suficientes?” “¿Estoy seguro de detectar apropiadamente los pequeños errores?” y “¿Es mi detección de errores lo suficientemente sensible para señalar si el sistema analítico es apropiado para las necesidades clínicas?” Si un laboratorio ha establecido adecuadamente los límites de error permisibles para las necesidades médicas, la segunda pregunta es solamente de interés académico, ya que la búsqueda de los errores más pequeños es costosa y requiere de mucho tiempo.

Una propuesta más científica para responder estas preguntas, utiliza curvas de poder para determinar cuántos controles deben ser ejecutados y qué reglas de control deben ser utilizadas. Las curvas de poder son gráficos del tamaño del error detectado por un sistema de control versus la probabilidad de detectar ese error por varias reglas de control. Las reglas de la curva de poder pueden calcular la probabilidad de rechazar falsamente una prueba válida, la probabilidad de rechazo verdadero (la detección de un error significativo en la serie), la probabilidad de detección del error, y el número promedio de observaciones de control requeridas para identificar un error dado.^{refs(380) refs(381)} El diseño de reglas de control específicas para un laboratorio requiere de un proceso de cinco pasos^{ref(382)} que incluyen la determinación de: (1) la definición del error analítico total permisible, (2) la estimación de la desviación estándar actual de los métodos y los sesgos las concentraciones de decisiones clínicas, (3) la determinación del error sistemático y aleatorio que debe ser detectado por el sistema de control, (4) determinación del nivel de probabilidad usado para la detección del error (esto es ¿se desea detectar un 90%, 95% o un 99% de errores?), y (5) trazado e inspección de las curvas de poder para determinar el número de especímenes de control que deben ser analizados por serie. La parte más difícil de estas evaluaciones es determinar qué cantidad de error es permisible.

Westgard utilizó estas curvas de poder, para desarrollar una serie de guías de control específicas, popularmente llamadas las “reglas de Westgard”. Estas reglas son utilizadas para determinar si una ejecución analítica está fuera de control y se escriben de forma resumida así: (1) 1_{2s} , $1_{2.5s}$, y 1_{3s} que significa que un valor de control excede dos, dos y medio o tres desviaciones estándar, (2) 2_{2s} significa que dos valores de control exceden dos desviaciones estándar y (3) R_{4s} significa que el rango de dos especímenes de control excede cuatro desviaciones estándar. Para muchas situaciones analíticas la aplicación secuencial de $1_{3s}/2_{2s}/R_{4s}$ permite que dos especímenes de control proporcionen suficiente información para detectar el error de una serie sencilla.^{ref(383)} Estas reglas significan que la serie es rechazada (se exceden límites de acción), si ocurre algo como: (1) 1_{3s} si un valor de control difiere por más de tres desviaciones estándar del valor medio, (2) 2_{2s} si dos valores de control difieren en más de dos desviaciones estándar del valor medio, y (3) R_{4s} si el margen entre dos controles en la misma ejecución excede una combinación de cuatro desviaciones estándar (esto es, un control ≥ 1.5 DE del promedio y el otro > -2.5 DE de promedio). Las dos primeras reglas van a detectar si hay demasiado sesgo, mientras que la última rechaza la ejecución debido a una imprecisión excesiva. Con el uso de estas reglas, los datos de la Fig. 21-1 muestran valores para un control que exceden los límites de acción en los días 10 (1_{3s}) y 20(1_{3s}). Note, que para el rechazo, el valor del control debe exceder el límite de control, y no sólo ser igual al mismo. Para muchas pruebas químicas, las curvas de poder permiten la detección costo-efectivo de errores totales significativos (basados en la utilidad clínica), cuando se utilizan dos controles y los límites se establecen en algún lugar entre 2.5 y 3.5 desviaciones estándar.^{ref(384)} Por esta razón, se utiliza bastante el límite de 3 DEU como un límite de control generalizado.

Detección y Resolución de Problemas de la Calidad

La decisión “fuera -de -control”

Un sistema analítico está “fuera de control” cuando no se considera apropiada la validez de los resultados. Los sistemas analíticos groseramente “fuera de control” son normalmente impropios para propósitos médicos. Esta decisión es tomada por el director o por el supervisor técnico.

Las condiciones y criterios para una decisión de “fuera de control” deben ser establecidos por cada laboratorio e incluyen los siguientes elementos mínimos:

1. Los valores de control exceden los límites de “fuera de control” predeterminados dentro de un período especificado. Los técnicos deben ser adiestrados a documentar sus respuestas a *todo* valor de control que exceda los límites establecidos.
 2. Se determina que un método tienen un intervalo de referencia inapropiado: si este rango no se puede corregir inmediatamente, el método queda “fuera de control”.
 3. Un método demuestra una imprecisión inaceptable, no linealidad o interferencias. Las interferencias se limitan generalmente a tipos de muestras o sustancias específicas.
 4. Se observa un patrón de resultados de pacientes inapropiado con numerosas anormalidades.
 5. El director del laboratorio, el director de sección o los supervisores técnicos declaran el método “fuera de control” por otras razones.
- Las técnicas para detectar y resolver situaciones de “fuera de control” se discuten a continuación.

Detección de problemas de calidad

Apoyo del ordenador.

Los valores diana y límites para resultados aceptables que están establecidos para cada “mezcla” de control, son usados en la práctica diaria para detectar problemas analíticos. Un tecnólogo puede revisar un resultado de control para evaluar su aceptabilidad de diferentes formas. Puede comparar simplemente el resultado con el rango establecido. Esto limita la habilidad del técnico para emplear las reglas Westgard o para evaluar la tendencia de resultados previos. Están disponibles ahora reglas de selección más complejas como parte de algunos programas de computación en los instrumentos, o como parte de los sistemas de información de laboratorio (SIL) (ver capítulo 18). La ayuda del computador permite revisar en tiempo real el control de los resultados, detectar rápidamente los problemas de CC y documentar mejor los procesos de control de calidad.

Gráficas de Levey-Jennings. [refs\(385\)](#)

Los datos obtenidos de los análisis diarios de las “mezclas” de control de calidad, pueden ser graficados para darles una presentación visual. El análisis más común es la gráfica de Levey-Jennings. Se dibujan en el eje de las y las concentraciones esperadas de los compuestos analizados, el valor diana establecido y el número de desviaciones estándar deseadas y en el eje de las x los días del mes (normalmente 31) (Fig. 21-1). Se puede utilizar una pieza grande de papel especial para gráficas, para mostrar los datos de diferentes meses. De este modo, la información acumulada de los resultados de control de la calidad puede ser observada al mismo tiempo. Las gráficas de Levey-Jennings están disponibles normalmente en

el SIL (ver capítulo 18).

La Figura. 21-1 muestra un ejemplo de una gráfica de Levey-Jennings. La variación repentina en los valores de control (días 1-4 versus 5-7) de un valor promedio a otro nuevo promedio se denomina “desvío o cambio”. El incremento de la desviación del valor diana observado desde el día 8 hasta el día 10 se llama “tendencia”. Se observan cambios en la precisión del sistema analítico entre los días 21 al 26, que es una mayor dispersión en los valores que lo observado en los días 13 y 19. Se consideró que el proceso era inaceptable por las razones documentadas al final de la Fig. 21-1. El día 32, el director del laboratorio volvió a evaluar el valor diana y concluyó que estaba muy alto. Se definió un valor más bajo y los resultados de CC para el mes siguiente fueron vigilados de cerca para evaluar este cambio.

Las gráficas de Levey-Jennings deben ser analizadas rutinariamente por los técnicos y el personal de supervisión. Tanto las tendencias negativas o positivas, o los desvíos del valor diana representan sesgos que deben ser evaluados. Los gráficos de Levey-Jennings deben ser evaluados rutinariamente por los tecnólogos y el personal supervisor buscando tendencias o desvíos del valor diana que puedan indicar problemas en el sistema analítico. Normalmente una tendencia o un desvío se detecta entre los 6 y 10 días después de iniciada. Una tendencia o un desvío que se mantiene por este tiempo, indica con frecuencia un cambio permanente, no aleatorio.

Utilización de los datos de los pacientes en la toma de decisiones

Patrón de resultados de los pacientes.

Los resultados de los análisis de las muestras de los pacientes caen dentro de intervalos de referencia establecidos para cada compuesto analizado. [ref\(386\)](#) De este modo, para una serie analítica de muestras de pacientes los resultados mantienen un patrón familiar: esto es, la mayoría de resultados están dentro del intervalo de referencia del paciente no enfermo y unos pocos resultados son anormales. La distribución de resultados patológicos, o sea, el porcentaje de resultados altos y bajos, variarán de una prueba en prueba y de un hospital a otro. Las desviaciones de este patrón de resultados deben alertar al personal que realiza las pruebas, sobre la posibilidad que un cambio en el desempeño del sistema pueda estar ocurriendo, que invalide resultados de los pacientes. Por ejemplo, una serie de resultados de pacientes para potasio, mayor de 5 debe indicar al técnico sobre un posible problema de sesgo (Tabla 21-5). El ejemplo en la Tabla 21-5 muestra un grupo típico de valores de potasio (paciente A) y una serie claramente anormal (paciente B). El técnico debe, por supuesto, evaluar circunstancias especiales. Por ejemplo una carga de trabajo que incluye un número más extenso que lo normal de muestras de pacientes de diálisis renal o sometidos a quimioterapias de cáncer, desviará anormalmente los patrones (que de otra manera serían típicos) de los resultados de las pruebas.

La prueba delta.

Otra prueba importante de control de calidad, es el patrón de resultados consecutivos para un paciente individual. Para la mayoría de los análisis, es improbable que una serie de dos a tres resultados consecutivos de un paciente muestren grandes diferencias, a menos que ocurra un cambio clínico suficientemente grande. Estas variaciones más allá de lo esperado entre dos muestras de un mismo individuo, se denominan *cambios delta* y son establecidos por el laboratorio para detectar problemas de confusión de especímenes u otro tipo de errores



(ver pág. 80). Cuando se producen, se tiene que determinar, si la variación es un cambio real del estado del paciente o si existen problemas en el laboratorio que no son identificados por el control de calidad.

Acciones para volver a tener un sistema analítico bajo control.

Cuando se encuentran problemas analíticos, lo mejor es tener un plan de acción que se ejecute en secuencias hasta que se resuelva el problema. CLIA'88 exige la documentación del problema, de su investigación, la resolución y cualquier dato que indique que está resuelto. Normalmente, esta documentación se mantiene aparte, en un cuaderno para documentación de "límites de acción" o "fuera de control" que incluya una lista de recomendaciones que deben ser seguidas en secuencia para identificar un problema. Después de que se ha seguido cada paso del plan de acción, se deben analizar las "mezclas" de rutina para CC; si los resultados están ahora entre los límites, se supone que el problema ha sido resuelto y se pueden liberar los resultados de los pacientes. Si los resultados de CC aún no son satisfactorios, se deben seguir las siguientes recomendaciones:

1. Repetir los ensayos de los controles, utilizando alícuotas frescas.
2. Repetir los ensayos de las muestras de control utilizando mezclas provenientes de un grupo de

controles diferente o recién reconstituido, ya que si algún control está mal manipulado, puede haber un cambio en las concentraciones analizadas debido al deterioro de las enzimas o a evaporación.

3. Buscar problemas obvios: coágulos, nivel de los reactivos, fallas mecánicas.
4. Calibrar nuevamente los instrumentos para el compuesto analizado que está "fuera de control" y después ensayar otra vez todos los controles.
5. Colocar un nuevo frasco o un número de lote diferente para uno o todos los reactivos.
6. Calibrar nuevamente y ensayar todos los controles.

Ejecutar el mantenimiento periódico, calibrar otra vez y volver a ensayar todos los controles. Si el seguimiento de estas recomendaciones produce datos de CC aceptables, se pueden liberar los resultados de los pacientes, si y sólo si, por lo menos tres (o la serie completa si es menor) muestras de pacientes tomadas de la última corrida, son ensayadas nuevamente y las diferencias entre los resultados previos y los nuevos están dentro de las especificaciones de desempeño para la precisión (ver pág. 391). Este requerimiento está establecido por la CLIA, que declara (§ 493.1219[b]) que: "todos los resultados de las pruebas de los pacientes obtenidos en la serie de pruebas no aceptable, o desde la última serie aceptada, tienen que ser evaluados para determinar si los resultados de los pacientes han sido adversamente afectados y el laboratorio tiene que tomar las acciones correctivas necesarias para asegurar un reporte exacto y confiable de los mismos."

Los tecnólogos deben estar estimulados para ejecutar por si mismos todas las recomendaciones mencionadas antes de solicitar ayuda de un supervisor. Sin embargo, en las áreas críticas del laboratorio deben fijarse límites de tiempo de interrupción para los instrumentos. En una sección de urgencias por ejemplo, sólo deben demorar resolviendo el problema alrededor de 15 a 20 minutos antes de notificar al supervisor.

Ejemplo: Al principio del día el método para potasio produjo resultados para el control elevados: por encima de 5 desviaciones estándar. El problema coincidió con el

cambio de reactivos, por lo tanto éstos se cambiaron. Se volvieron a calibrar los equipos y los controles se repitieron, encontrándose nuevamente bajo control. Tres muestras de pacientes de la última serie se probaron otra vez para averiguar si el problema había afectado los valores reportados. Los resultados de potasio obtenidos en la primera serie fueron 3,9, 4,6, y 5,3 mmol/L y cuando se repitieron 4,1, 4,5 y 5,3 mmol/L. El requerimiento de desempeño de precisión para el método de potasio es $1\text{ DE}=0,11\text{ mmol/L}$. Los resultados de potasio de los pacientes cambiaron $<0,22\text{ mmol/L}$. Este valor es menor que un cambio de 2 DE; por lo tanto el reporte anterior no tenía que cambiarse. Esta nueva evaluación del resultado de un paciente debe continuar hasta que se perciba una diferencia significativa o la muestra de control de calidad alcance los resultados aceptados previamente.

Cuando las repeticiones de las muestras de los pacientes producen diferencias que no pueden ser aceptadas, se deben repetir *todos* los especímenes analizados después del último control que fue aceptado. Si los problemas persisten, las pruebas deben ser realizadas en un sistema alternativo o enviadas a un laboratorio de referencia. Si la cantidad de muestra de un paciente es insuficiente para ser evaluada nuevamente, el laboratorio debe solicitar otra muestra. Es inapropiado reportar un resultado cuando la calidad del ensayo está cuestionada.

7. Ensayar un control diferente, de concentración similar y conocida para determinar si el material de control original está fallando. Es una buena política tener materiales de control diferentes de los utilizados en la rutina, con valores de ensayo confiables, apropiados para ser utilizados en estas situaciones. La determinación de un cambio en el valor del ensayo del material de control (la cual requiere que el valor diana sea reajustado) debe ser realizada solamente por el director o por el supervisor técnico. Si los valores para una “mezcla” de CC ha cambiado ligeramente asumiendo un nuevo patrón, pero el sistema analítico parece estable (a juzgar por los datos de otros materiales de CC), entonces los valores diana de la “mezcla” de rutina de CC deben ser cambiados. Tales cambios deben ser autorizados por el director del laboratorio y el proceso de decisión debe ser documentado. Si sólo uno de los controles muestra un ligero cambio, mientras un material de concentración similar y el sistema analítico total continúan dando un valor estable, se puede asumir que la estimación inicial del valor diana del material de control fue fijada incorrectamente. En este caso el valor diana debe ser modificado. Si los controles de rutina y los controles adicionales muestran cambios o tendencias similares, el problema está probablemente en el sistema analítico.

8. Llamar al fabricante para ayudar a determinar la causa del problema. Seguir las instrucciones del fabricante y ensayar de nuevo todos los controles.

9. Darle mantenimiento a los equipos por el fabricante, calibrar de nuevo y realizar otra vez los ensayos de todos los controles.

10. Usar materiales comerciales para exactitud con el fin de evaluar la calidad del sistema analítico, verificar la linealidad, (rango reportable), exactitud, sesgo, precisión, sensibilidad analítica, y cambio mínimo detectable (cambio más pequeño de concentración que es significativo). Evaluar estos datos con el fin de observar si revelan la causa del problema. Ejecutar pruebas paralelas en muestras de pacientes en un segundo instrumento, puede ser de gran ayuda en este punto.

11. Determinar si el sistema analítico ha cambiado evaluando nuevamente el intervalo de referencia. Usted puede hacer esto con los datos obtenidos de los últimos 100 pacientes, que tienen perfiles químicos normales con dos o menos anormalidades ligeras (los pacientes aceptables son determinados por el director o por el supervisor técnico). Estimar el



intervalo de referencia excluyendo el 2.5% de los valores extremos de la distribución. Este intervalo debe estar de acuerdo (dentro de 1 DE) con los intervalos de referencia establecidos por el laboratorio. Este procedimiento sólo demuestra cambios grandes en el sistema. El director o supervisor técnico debe determinar si ha ocurrido un cambio significativo en el intervalo de referencia.

12. Establecer de nuevo la linealidad del método utilizando cualquiera de los protocolos EP-6 o EP-10 del Comité Nacional para Estándares de Laboratorios Clínicos ("NCCLS" por sus siglas en inglés). Si el método es lineal sobre el rango reportado y el intervalo de referencia no ha cambiado, el método es probablemente utilizable ajustando apropiadamente los valores diana de las muestras de control.

13. Consultar con el director o con el supervisor técnico para declarar el método "fuera de control" si los pasos anteriores fallan.

14. Una acción final es la sustitución del método o del instrumento por uno que le permita al laboratorio cumplir con sus requerimientos clínicos y de los ensayos de aptitud.

Cada decisión de control de calidad debe ser anotada en un registro permanente. Para cumplir con los requerimientos del CLIA'88, estos registros de control de calidad deben: declarar los límites aceptables e incluir las acciones realizadas en respuesta a los valores "fuera de control", con la fecha, compuesto analizado, sistema analítico completo (o sea, procedencia de los reactivos, instrumentos, calibradores y controles), descripción del problema, su resolución, y nombres de las personas que ejecutaron la prueba y aprobaron las acciones finales. Sería conveniente preparar formularios para revisión o gráficos para cada control y compuesto analizado (Fig. 21-2). Estos registros también son útiles para predecir las necesidades de mantenimiento, reparación o reemplazo de reactivos deteriorados como se indica en las marcas de revisión encerradas en círculo en la Figura 21-2. Los registros computarizados pueden simplificar y agilizar los procesos de documentación.

Medidas a tomar cuando un método está fuera de control

1. La decisión de que un sistema analítico está fuera de control y debe ser suspendido debe ser comunicada a todo el personal del laboratorio incluyendo al director, consultor técnico, supervisor técnico, consultor clínico, supervisor general y a todo el personal encargado de las pruebas. Como se mencionó arriba, el rango de tiempo para hacer conocer este problema puede variar de sección a sección y debe estar declarado en el manual del laboratorio.

2. La suspensión de un sistema analítico significa que no se puede liberar ningún resultado de pruebas nuevas de pacientes, hasta que la condición de fuera de control sea corregida y el director o supervisor técnico aprueben la reanudación de la prueba.

3. Se deben tomar medidas para ejecutar la prueba ya sea por un método alternativo o en un laboratorio de referencia. El procedimiento alternativo debe ser registrado en el manual del laboratorio y notificar a los médicos apropiados si esta modificación tendrá alguna influencia sobre los resultados de las pruebas o sobre el tiempo de retorno de los resultados.

4. Una condición de fuera de control que no puede ser tratada con el uso de métodos o sistemas analíticos alternativos, debe ser comunicada dentro de un tiempo razonable al personal médico y a todas las personas autorizadas (como por ejemplo el



personal administrativo de nivel intermedio).

5. El supervisor deberá definir las condiciones fuera de control que difieren de las expuestas en la política general por razones médicas o analíticas. Estas condiciones excepcionales deben ser documentadas en el procedimiento, al igual que en el archivo de métodos.

6. Para volver a incorporar una prueba suspendida a la producción se necesitan como mínimo las siguientes acciones: El método debe ser recalibrado o se debe realizar una verificación de la calibración. Se deben usar dos niveles de controles y por lo menos otro material de valor conocido o establecido como por ejemplo el utilizado en los ensayos de aptitud. El método puede ser usado cuando los resultados de las muestras conocidas están dentro del promedio esperado ± 2 veces la desviación estándar usual apropiada (establecido para una concentración cercana al valor del control que estaba fuera de control). La reutilización del método debe ser autorizada por el supervisor técnico o por el director. Esta autorización debe estar documentada firmada y fechada formalmente en el registro de problemas del laboratorio.

Procedimientos a seguir cuando un sistema analítico falla.

Una condición fuera de control que no puede ser reparada inmediatamente puede constituir una emergencia del laboratorio que puede ser manejada utilizando un método alternativo, un laboratorio de referencia o descontinuando temporalmente la prueba. Un laboratorio debe tener preparado siempre un método de análisis alternativo o de reserva en el manual de procedimientos. La política del laboratorio debe definir cuánto tiempo puede utilizar el técnico investigando fallas en un método antes de usar el método de alternativa. Otros factores que afectan la decisión son: los requerimientos médicos de las pruebas (urgencias Vs. rutina), el personal del laboratorio y la carga de trabajo del mismo. Por ejemplo, un análisis de potasio de emergencia sería tratado de una manera muy diferente a uno de grasa fecal de 72 horas. En el caso de la prueba del potasio, una demora de más de 30 minutos en proveer un análisis de reserva de emergencia, podría afectar la decisión médica, mientras que una demora de algunos días en el análisis de grasa en materia fecal no sería crucial para el cuidado del paciente. Durante una falla en el sistema analítico, las decisiones sobre las muestras de los pacientes en proceso deberían ser hechas consultando al supervisor o al consultor técnico de laboratorio y al director como se especifica en la política del laboratorio.

Calibración y Control de Calidad

Uso de calibradores

Los controles no pueden usarse como calibradores. Deben ser diferentes porque cada uno tiene funciones individuales importantes. Los calibradores establecen los valores reportados con exactitud, mientras que los controles evalúan la estabilidad y exactitud de esos calibradores y del sistema analítico. Sin embargo, para las pruebas que no tienen disponibles controles apropiados, la CLIA 88 permite utilizar los materiales de calibración como controles y en ese caso lo mejor es analizar la estabilidad del sistema con materiales de calibración diferentes de aquellos usados para la calibración del sistema analítico.

Un calibrador disponible comercialmente, tiene un valor asignado que el fabricante establece utilizando un método definitivo o de referencia o usando materiales de referencia



(rastreado con estándares primarios). Los calibradores definen el valor reportado por el método o instrumento del laboratorio, estableciendo una relación entre la respuesta del instrumento y las concentraciones conocidas. Las diferencias entre una matriz acuosa y una de suero pueden afectar la transferencia de concentraciones conocidas a resultados reportados. Estas diferencias entre matrices incluyen la turbidez y la tensión superficial, que pueden afectar: el sistema para dispensar las muestras, las interacciones entre las sustancias a analizar y proteínas y el efecto de la fracción del volumen ocupado por proteínas u otras moléculas grandes (especialmente lipoproteínas) sobre la concentración real de los compuestos analizados.

Los calibradores son adquiridos usualmente en lotes lo suficientemente grandes para el consumo de 12 meses o más. Es recomendable que un lote nuevo de material de calibración sea probado 6 semanas antes de ser usado. Este tiempo le permite al laboratorio detectar cualquier error sistemático entre el valor del calibrador en uso y el nuevo. El sesgo de un nuevo lote de calibrador se detecta cuando se observan cambios en el valor promedio de la “mezcla” de control de calidad o en los resultados de las pruebas de los pacientes. Algunos sistemas analíticos no le permiten a los calibradores (especialmente a calibradores de otros sistemas) ser procesados como muestras desconocidas debido a interferencias de matriz. A menudo un calibrador tendrá valores asignados que no representan valores reales del compuesto analizado. Estos calibradores con valores asignados están diseñados para calibrar sistemas analíticos que produzcan valores exactos cuando se procesan las muestras de los pacientes. Aunque la FDA requiere que los fabricantes utilicen métodos de referencia para asignar los valores de los calibradores, se presentan con frecuencia diferencias significativas entre diferentes lotes. Se pueden cometer errores dentro del proceso de calibración, si estos no están diseñados específicamente para el sistema analítico. Debido a efectos de matriz. Según CLIA’88 cualquier modificación de las instrucciones del fabricante para la porción analítica de un procedimiento aprobado por la FDA requiere documentación de la validez del cambio. Un laboratorio que desee cambiar un punto de calibración establecido por el fabricante, tiene que documentar que el cambio no afecta adversamente las especificaciones de desempeño del método.

Un sistema práctico para la verificación de un nuevo calibrador

1. Utilizar un período de verificación de 10 días.
2. Si el fabricante permite el ensayo de calibradores como muestras desconocidas, insertar cada día 2 alícuotas de un frasco de un nuevo calibrador dentro del trabajo de rutina diario ($n = 10$ frascos; 20 valores). Calcular el promedio para cada compuesto analizado. Comparar cada promedio con el valor asignado por el fabricante. Cualquier diferencia entre los valores asignados y los medidos, permitirá predecir el cambio del promedio del valor diana de las mezclas de CC (y también el de los valores de las pruebas de pacientes) cuando se introduzca el calibrador nuevo. Un cambio en el valor diana de la “mezcla” de CC mayor que 1,0 desviación estándar usual, es significativo estadísticamente y se debe tomar una decisión en cuanto a cuál valor del calibrador es verdaderamente exacto. Esta decisión tiene que incluir la consideración de los requerimientos de la CLIA (especialmente en lo referente a los ensayos de aptitud) y la consulta con el fabricante.

La CLIA’88 establece que cuando los valores del control muestren cambios



significativos (definidos por cada laboratorio), el laboratorio debe verificar que la calibración no ha cambiado para poder garantizar la calidad de los resultados de los pacientes. Para hacerlo es necesario procesar tres calibradores de valores bajo, medio y alto, que pueden ser controles, calibradores, u otras muestras con valores conocidos. Si el fabricante ha especificado un protocolo de verificación de la calibración, el laboratorio puede seguirlo (§ 493.1217). Las reglas de la CLIA no establecen la medida de error permisible, excepto cuando se evalúa los ensayos de aptitud. Si se define un error aceptable muy grande, el laboratorio aumenta el riesgo de fallar en el programa de control externo y puede afectar los resultados de las pruebas de los pacientes. Las especificaciones de desempeño pueden ser usadas para juzgar un cambio excesivo (ver Tabla 21-3).

Control de calidad para el cambio de reactivos y el mantenimiento de equipos.

La calidad de cada entrega o lote de reactivos diferente (incluyendo calibradores y “mezclas” de control de calidad) tiene que ser evaluada antes de ser puestos en uso. El laboratorio puede definir que son aceptables, si los valores del control no cambian significativamente cuando se empiezan a utilizar. De igual manera es una buena práctica que después de realizar cualquier mantenimiento, se prueben un grupo de controles y se procesen varias muestras de pacientes de una serie anterior antes de que la prueba sea consolidada. Los problemas de mantenimiento pueden ocasionar una situación de “límite de acción”, debido a que se pueden alterar los parámetros operativos. Se debe llevar un registro cronológico de todos los cambios de reactivos, reparaciones de instrumentos y procedimientos de mantenimiento, junto con las pruebas de verificación de calibración.

Programas de Control de Calidad Externos y Otras Herramientas para el Control de la Exactitud

Control de exactitud requerido por el CLIA '88

La CLIA 88 exige que todos los laboratorios que tengan licencia para realizar pruebas de mediana o alta complejidad tienen que participar satisfactoriamente en programas de control externo. Las muestras de los ensayos de aptitud son utilizadas para evaluar el adecuado funcionamiento del laboratorio en todas las especialidades. El analista tiene que analizar estas muestras de la misma manera que los especímenes de los pacientes. Históricamente los ensayos de aptitud han constituido un proceso educacional, pero ahora tiene una función reguladora y las fallas ocasionan serios sanciones. Sin embargo, su verdadera importancia reside en que suministra una validación de los sistemas analíticos que es independiente de los programas de control de calidad interno. Algunos de los proveedores de programas de ensayos de aptitud aprobados por la Administración Financiera del Cuidado de la Salud (Marzo de 1993), se mencionan en la Tabla 21-6. Debido a que el analista no conoce el valor diana de las muestras los ensayos de aptitud, es difícil para el operador influenciar los resultados. Estos programas, si son usados correctamente, pueden dar un estimativo de la exactitud inherente a un sistema, por lo menos como comparación con un grupo semejante de laboratorios, o con un promedio global.^{ref(387)} Las desviaciones continuas o significativas de los niveles diana de los ensayos de aptitud, aún si no existen fallas, deben alertar al laboratorio sobre un posible problema de exactitud. Si la DEU de un compuesto analizado no es

significativamente más pequeña que la DE del grupo comparativo, ese método está en riesgo creciente de falla en el ensayo de aptitud.

El desempeño en los ensayos de aptitud permite también realizar un estimativo del sesgo del sistema, sustrayendo los valores obtenidos en el laboratorio con cada método analítico específico, del valor promedio reportado por los métodos similares (promedio de un grupo igual) o el valor promedio de todos los métodos, o el valor del método definitivo. El símbolo algebraico define si el valor de su método es más alto o más bajo que el promedio del grupo. Observe, que la comparación con un promedio de grupos iguales o aún con el promedio de todos los participantes no establece exactitud; únicamente muestra la desviación frente a un valor comparativo. La exactitud es determinada sólo, cuando el valor de comparación es el valor verdadero. Ciertamente, la obtención de sesgos en los ensayos de aptitud en forma repetida, debe levantar sospechas de la existencia de un sesgo verdadero y se requerirá efectuar procesos adicionales para comprobar o refutar la existencia de dicho sesgo.

Métodos definitivos y de referencia

Los métodos definitivos y de referencia son establecidos por el Sistema Nacional de Referencia para el Laboratorio Clínico, ("NRSCL, por sus siglas en inglés") a través solicitudes de grupos de personas interesadas, que representan diferentes disciplinas y organizaciones, sociedades profesionales o especialistas, compañías industriales y agencias gubernamentales. La NRSCL es una parte del NCCLS. Los métodos definitivos y de referencia son utilizados para producir materiales de referencia basados en exactitud. (ver más adelante).

Un *método definitivo*^{refs(388)} es la manera más exacta de medir una determinada sustancia química. El análisis por métodos definitivos normalmente involucra instrumentos altamente sofisticados y un proceso de separación para purificar el compuesto analizado antes de medir su concentración. Estos métodos están disponibles en instituciones como el Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST), Centros para el Control y Prevención de Enfermedades y grandes laboratorios de referencia. La Tabla 21-7 muestra los 7 métodos definitivos y los 18 de referencia definidos por el NRSCL.

Un *método de referencia*^{ref(389)} se prueba menos rigurosamente que un método definitivo, pero se acepta bien porque existe una evidencia considerable de su capacidad analítica. El método de referencia tiene un registro que demuestra una excelente capacidad para transferir su exactitud. El equipo y la metodología usados por estos métodos son tales, que solamente están disponibles en laboratorios de hospitales universitarios. Si un método definitivo no está disponible para hacer una comparación, el método de referencia se establece por el consenso entre las autoridades en este campo. En la Tabla 21-7 se presentan los métodos de referencia acreditados por el NRSCL. Existen otros que serán aprobados por el NRSCL en el futuro cercano. Actualmente el NRSCL está definiendo las especificaciones para implementar métodos de comparación que puedan ser utilizados de inmediato por muchos laboratorios.

Un *método de campo* es un método de uso común. No está clasificado como uno de referencia o definitivo. Ha sido comparado con un método de referencia y ha mostrado resultados comparables, que son aceptables para el usuario. Una suficiente información de las evaluaciones y comparaciones de estos métodos, está disponible en la literatura médica y a menudo en la del fabricante de un sistema analítico.

Materiales de referencia

Actualmente están disponibles comercialmente, materiales acuosos y proteicos que podrían ser usados como controles o calibradores para determinar o hacer seguimiento a la exactitud de las pruebas de laboratorio. Cada uno de estos materiales de referencia son útiles para investigar la exactitud de un método. Las concentraciones diana reales son asignadas mediante la utilización de métodos definitivos o de referencia. Alternativamente, el material de referencia es preparado con una concentración específica mediante la adición de cantidades conocidas de compuestos analizados de alta pureza. Estos valores asignados reales son los valores más exactos que se pueden obtener con el estado del arte de la tecnología y por esta razón se prefieren cuando están disponibles. Un ejemplo de material de referencia de ese tipo, es el SRM909, suero humano liofilizado producido por el NIST, que contiene un número de constituyentes con niveles establecidos por métodos definitivos y de referencia.

Existen otros materiales (similares a materiales de control de calidad) que tienen valores de consenso, es decir, establecidos por miles de laboratorios. Estos datos son reportados como valores promedio generales, o valores promedio de métodos realizados mediante sistemas de ensayo específicos. El Colegio de Patólogos Americanos produce sueros validados por encuestas que establecen los valores mediante miles de ensayos individuales de laboratorios que participan en los programas de ensayos de aptitud. [ref\(390\)](#) Algunos sistemas mostrarán efectos de matriz ocasionados por el proceso de liofilización o la presencia de compuestos que interfieren, por lo tanto se debe tener cuidado cuando se utilizan como únicos evaluadores del sesgo de un sistema analítico.

Los estándares primarios se requieren siempre para utilizar los métodos definitivos y de referencia. El NIST provee un número de materiales de referencia que podrían ser utilizados para preparar estándares primarios líquidos. Estos incluyen: albúmina, angiotensina, drogas anticonvulsiantes, aspartato aminotransferasa, bilirrubina, gases sanguíneos, calcio, cloruro, colesterol, cortisol, creatinina, electrolitos para electrodos selectivos de iones, vitaminas liposolubles, glucosa, ion hidrógeno, iones inorgánicos en suero bovino, hierro, plomo, litio, magnesio, potasio, fósforo, sodio, metales trazas en suero, tripalmitato, urea y ácido úrico. Los materiales acuosos envasados en frascos sellados preparados con estándares primarios NIST están disponibles en el CAP. Cuando se utilizan los materiales de referencia NIST para calibración, debe especificarse que la exactitud del método es rastreable con materiales de referencia NIST. Es esencial que la matriz del calibrador preparado sea consistente con los requerimientos de los sistemas analíticos, ya que algunos de ellos requieren proteínas u otros constituyentes en el calibrador para que funcione apropiadamente en el sistema analítico. Se puede obtener un catálogo de materiales de referencia (publicación especial 260 de NIST) en el siguiente número telefónico: 1-301-975-6776.

Selección de un laboratorio de referencia como soporte en el control de exactitud

Un procedimiento que puede utilizar un laboratorio para confirmar la exactitud de un método, es enviar alícuotas de muestras de pacientes a un laboratorio de referencia confiable. Es importante, sin embargo, estar completamente seguro de la calidad del trabajo analítico de dicho laboratorio. Se debe disponer siempre de información sobre la exactitud y precisión de sus métodos analíticos. El laboratorio debe solicitar una lista de los métodos exactos y las especificaciones de desempeño utilizadas por el laboratorio de referencia, así como de sus



resultados de los ensayos de aptitud. El laboratorio debe evaluar cuidadosamente todos los datos para determinar si los métodos son apropiados para sus necesidades. El método del laboratorio es considerado exacto si sus resultados no son significativamente diferentes a los del laboratorio de referencia.

Responsabilidad de los fabricantes en el control de los sistemas analíticos

La responsabilidad de resolver los problemas de los errores sistemáticos y aleatorios no es sólo del usuario sino que debe ser compartida con el fabricante de equipos y reactivos. Estos deben suministrar las especificaciones del desempeño de tal forma que el laboratorio pueda definir si el sistema puede ser utilizado apropiadamente para cumplir con los requerimientos médicos y de la CLIA. Después de que el laboratorio selecciona un sistema analítico, el supervisor técnico debe determinar (a menudo con el fabricante) si las especificaciones de desempeño se cumplen en el proceso del laboratorio. La revisión cuidadosa de los resultados de las encuestas nacionales de aptitud, rápidamente revela que existen sistemas de instrumentos y reactivos que presentan errores sistemáticos significativos al analizar las muestras de los ensayos de aptitud. Las muestras de estos programas son las mismas o muy similares a las utilizadas en las evaluaciones de control de calidad. Sin embargo, algún sesgo puede aparecer sólo debido a la diferencia en la matriz de los materiales de control. [ref\(391\)](#) Estas que no se presentan cuando se analizan muestras frescas de pacientes. La presencia de errores de matriz se evidencia mediante análisis de especímenes humanos frescos y de materiales de control por los métodos del laboratorio y un método diferente que no presente el error de matriz. Cualquier diferencia encontrada entre los métodos debe resultar del efecto de matriz.

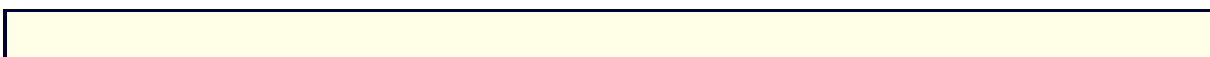
Los problemas analíticos que no puedan ser resueltos después de consultar con el fabricante, deben ser reportados a través del sistema de reporte de la FDA, administrado por la Farmacopea Americana con el siguiente número telefónico: 1-800-638-6725.

Referencias

1. Barnett RN: Analytic goals in clinical chemistry: the pathologist's viewpoint. In *Analytical goals in clinical chemistry*, Northfield, Ill., June 1977, College of American Pathologists, pp 319-322.
2. Barnett RN: Clinical laboratory statistics, ed 2, Boston, 1979, Little, Brown & Co.
3. Bowers GN Jr: Clinical chemistry analyte reference systems based on true value, *Clin Chem* 37:1665-1666, 1991.
4. Breitenberg M: *Questions and answers on quality, the ISO 9000 standard series, quality systems registration, and related issues*, US Department of Commerce, National Institute of Standards and Technology Publication NISTIR 4721, Gaithersburg, Md., 1991, USDC.
5. Carey RN: Implementation of multi-rule quality control procedures, *Lab Med*, pp 393-399, June 1989.
6. Castaneda-Mendez K, Chemometrics: measurement reliability, *Clin Chem* 34:2494-2498, 1988.
7. Cotlove E, Harris EK, Williams GZ: Biological and analytic components of variation in long-term studies of serum constituents in normal subjects: III. Physiological and medical implications, *Clin Chem* 16:1028-1032, 1970.
8. Dorsey DB: Evolving concepts of quality in laboratory practice: a historical overview of quality assurance in clinical laboratories, *Arch Pathol Lab Med* 113:1329-1334, 1989.
9. Douville P, Cembrowski, GS: An approach to the use of clinical limits for quality control, *Lab Med*, pp 406-409, June 1989.



10. Ehrmeyer SS, Laessig RH: The relationship of intralaboratory bias and imprecision on laboratories' ability to meet medical usefulness limits, *Am J Clin Pathol* 89:14-18, 1988.
11. Ehrmeyer SS, Laessig RH, Leinweber JE, Oryall JJ: 1990 Medicare/CLIA final rules for proficiency testing: minimum intralaboratory performance characteristics (CV and bias) needed to pass, *Clin Chem* 36:1736-1740, 1990.
12. Elion-Gerritzen WE: Analytic precision in clinical chemistry and medical decisions, *Am J Clin Pathol* 73:183-195, 1980.
13. Fraser CG: The application of theoretical goals based on biological variation data in proficiency testing, *Arch Pathol Lab Med* 112:404-415, 1988.
14. Gilbert RK: Progress and analytic goals in clinical chemistry, *Am J Clin Pathol* 63:960-973, 1975.
15. Gilbert RK: Accuracy of clinical laboratories studied by comparison with definitive methods, *Am J Clin Pathol* 70:450-470, 1978.
16. Groth T, Falk H, Westgard JO: An interactive computer simulation program for the design of statistical control procedures in clinical chemistry, *Comput Programs Biomed* 13:73-86, 1981.
17. Hardin E, Passey R, Gillum RL, et al: The use of "clear" enzyme control materials, *Am J Med Technol* 45:183-185, 1979.
18. Harris EK: Statistical principles underlying analytic goal-setting in clinical chemistry, *Am J Clin Pathol* 72:374-382, 1979.
19. Hartmann AE, Naito HK, Burnett RW, Welch MJ: Accuracy of participant results utilized as target values in the CAP Chemistry Survey Program, *Arch Pathol Lab Med* 109:894-903, 1985.
20. Koch DD, Oryall JJ, Quam EF, et al: Selection of medically useful quality-control procedures for individual tests done in a multitest analytical system, *Clin Chem* 36:230-233, 1990.
21. Ladenson JH: Patients as their own controls: use of the computer to identify laboratory error," *Clin Chem* 21:1648-1653, 1975.
22. Lasky FD: Proficiency testing linked to the National Reference System for the Clinical Laboratory: a proposal for achieving accuracy, *Clin Chem* 38:1260-1267, 1992.
23. Levey S, Jennings ER: The use of control charts in the clinical laboratory, *Am J Clin Pathol* 20:1059-1066, 1950.
24. Linnet K: Choosing quality-control systems to detect maximum clinically allowable analytical errors, *Clin Chem* 35:284-288, 1989.
25. National Cholesterol Education Program: *Recommendations for improving cholesterol measurements*, NIH Publication No. 90-2964, Bethesda, Md., Feb. 1990, US Department of Health and Human Services, National Institutes of Health.
26. National Committee for Clinical Laboratory Standards: *Development of definitive methods for the National Reference System for the Clinical Laboratory, approved guideline*, NCCLS publication NRSC1-A (ISBN 1-56238-104-0), Villanova, Penn., 1991, NCCLS.
27. National Committee for Clinical Laboratory Standards: *Development of Reference Methods for the National Reference System for the Clinical Laboratory, approved guideline*, NCCLS publication NRSC2-A (ISBN 1-56238-105-9), Villanova, Penn., 1991, NCCLS.
28. National Committee for Clinical Laboratory Standards: *Development of certified reference materials for the National Reference System for the Clinical Laboratory, approved guideline*, NCCLS publication NRSC3-A (ISBN 1-56238-106-7), Villanova, Penn., 1991, NCCLS.
29. Oxley DK: Cholesterol measurements: quality assurance and medical usefulness interrelationships, *Arch Pathol Lab Med* 112:387-391, 1988.
30. Parvin CA: Comparing the power of quality-control rules to detect persistent systematic error, *Clin Chem* 38:358-363, 1992.
31. Parvin CA: Comparing the power of quality-control rules to detect persistent increases in random error, *Clin Chem* 38:364-369, 1992.
32. Ross JW, et al: Goals for allowable analytical error better based on medical usefulness criteria, *Am J Clin*



- Pathol* 85:391-392, 1986.
33. Shewhart WA: *Economic control of quality of the manufactured product*, New York, 1931, Van Nostrand Co.
 34. Skendzel LP: How physicians use laboratory tests, *JAMA* 239:1077-1080, 1978.
 35. Skendzel LP, Barnett RN, Platt R: Medically useful criteria for analytic performance of laboratory tests, *Am J Clin Pathol* 83:200-205, 1985.
 36. Tonks DB: A study of the accuracy and precision of clinical chemistry determination in 170 Canadian laboratories, *Clin Chem* 9:217-233, 1963.
 37. Turcotte G, Bourget C, Talbot J, et al: Analytic clinical chemistry precision and medical needs: the Canadian interlab program (CID), *Am J Clin Pathol* 74:336-339, 1980.
 38. Uldall A: Quality assurance within clinical chemistry- brief review emphasizing "good laboratory practice," *Scand J Clin Lab Invest* 47(suppl 187):507-518, 1987.
 39. Velapoldi RA, Paule RC, Schaffer R, et al: *A reference method for the determination of potassium in serum*, NBS spec pub no 260-63, Washington, D.C., 1979, National Measurement Laboratory, National Bureau of Standards.
 40. Westgard JO, Groth T, Aronsson T, et al: Performance characteristics of rules for internal quality control: probabilities for false rejection and error detection, *Clin Chem* 23:1857-1867, 1977.
 41. Westgard JO, Groth T: Power functions for statistical control rules, *Clin Chem* 25:863-869, 1979.
 42. Westgard JO, Barry PL, Hunt MR, Groth T: A multi-rule Shewhart chart for quality control in clinical chemistry, *Clin Chem* 27:493-501, 1981.
 43. Westgard JO, Oryall JJ, Koch DD: Predicting effects of quality-control practices on the cost-effective operation of a stable multitest analytical system, *Clin Chem* 36:1760-1764, 1990.

Bibliografía

Internal quality control testing: principles and definitions, approved guideline (1991), C24-A', NCCLS, 771 East Lancaster Avenue, Villanova, PA 19085.

Method comparisons and bias estimation using patient samples, tentative guideline (1993), EP9-T, NCCLS, 771 East Lancaster Avenue, Villanova, PA 19085.

Precision performance of clinical chemistry devices, ed 2, tentative guidelines (1992), EP5-T2, NCCLS, 771 East Lancaster Avenue, Villanova, PA 19085.

Preliminary evaluation of clinical laboratory methods, ed 2, tentative guidelines (1993), EP10-T2, NCCLS, 771 East Lancaster Avenue, Villanova, PA 19085.

Tablas

Tabla 21-1. Especificaciones de desempeño para el error total (%).*

Prueba	Analítica †	Médica ‡	CLIA '88§
Albúmina	13-15	---	10
Fosfatasa alcalina	10-15	---	30 ASAT
(aspartato aminotransferasa)	5-20	14-26	20
Bilirrubina total	2-16	5-28	20% o 4 mg/L
BUN (nitrógeno úrico sanguíneo)	18-33	12-25	9% o 20 mg/L
Calcio	5.5-6.4	5-7	10 mg/L
Cloruro	5	---	5

Colesterol	1-14	9	10
HDL-colesterol	5	---	30
Creatina cinasa (CC)	8-10	---	30
Creatina	15-47	10-20	15% o 3mg/L
Glucosa	5-11	11-16	10% o 60mg/L
Hierro	---	17	20
Lactato deshidrogenasa (LD)	7-8	---	20
Fósforo	4-10	14-17	NA
Potasio	10-12	5-10	0.5μmol/L
Proteínas totales	7-8	8	10
Sodio	5-6	2-3	4μmol/L
Triglicéridos	10-16	16	25

NA, no aplicable

* Error analítico total calculado por: T.E. = Sesgo + 1.96 x desviación estándar † Dato del Centro Médico ‡ Dato del Centro Médico de Oklahoma, Universidad de Oklahoma. Los sistemas examinados incluyen Beckman CX3 y Kodak 700XRC; las diferencias de sesgo entre estos dos sistemas son fuentes importantes del alto error total. La diferencia entre los sistemas es parte del error en el resultado del paciente cuando se usan intercambiadamente sistemas diferentes.

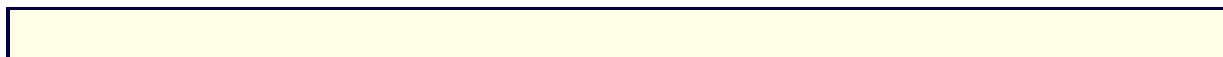
‡ Redondeando al porcentaje entero más cercano. (De: Skendzel LP, Barnett RN, Platt R: *Am J Clin Pathol* 83:200-205, 1985.)

§ Las pruebas y el desempeño aceptable son del *Federal Register*, p7158, Feb. 28, 1990.

|| Las metas médicas de colesterol son ahora ajustadas a 3% del sesgo y 3% de la imprecisión. (De: NCEP: NIH Pub. No. 90-2964, 199025).

Tabla 21-2. Desempeño requerido por la CLIA en los programas de control externo (Registro Federal, Feb. 28, 1992).

Compuesto analizado o Prueba desempeño aceptable	Criterio para un
<u>Pruebas inmunológicas</u>	
Alfa1- antitripsina	Valor objetivo ± 3SD
Alfa- fetoproteína (marcador tumoral)	Valor objetivo ± 3SD
Anticuerpo antinuclear	Valor objetivo ± 2 diluciones o positivo o negativo
Antitriptolisina 0	Valor objetivo ± 2 diluciones o positivo o negativo
Virus de inmunodeficiencia antihumano	Reactivo o no reactivo
Complemento C3	Valor objetivo ± 3SD
Complemento C4	Valor objetivo ± 3SD
Hepatitis (HBsAg, anti-HBc, HBeAg) (negativo)	Reactivo (positivo) o no reactivo
IgA	Valor objetivo ± 3SD
IgE	Valor objetivo ± 3SD



IgG	Valor objetivo \pm 25%
IgM	Valor objetivo \pm 3SD
Mononucleosis infecciosa positivo o negativo	Valor objetivo \pm 2 diluciones o
Factor reumatoideo positivo o negativo	Valor objetivo \pm 2 diluciones o
Rubeola	Valor objetivo \pm 2 diluciones o inmune o no inmune o positivo o negativo

Compuesto analizado o Prueba acceptable	Criterio para un desempeño acceptable
--	--

Pruebas químicas

Alanina aminotransferasa (SESGo/SGPT)	Valor objetivo \pm 20%
Albúmina	Valor objetivo \pm 10%
Fosfatasa alcalina	Valor objetivo \pm 30%
Amilasa	Valor objetivo \pm 30%
Aspartato aminotransferasa (ASAT/SGOT)	Valor objetivo \pm 20%
Bilirrubina total	Valor objetivo \pm 4mg/L ó \pm 20% (mayor)
Gases sanguíneos PO ₂	Valor objetivo \pm 3SD
PCO ₂	Valor objetivo \pm 5 mm Hg ó \pm 8%
(mayor)	
pH	Valor objetivo \pm 0.04
Calcio total	Valor objetivo \pm 10 mg/L
Cloruro	Valor objetivo \pm 5%
Colesterol total	Valor objetivo \pm 10%
HDL-colesterol	Valor objetivo \pm 30%
Creatina cinasa	Valor objetivo \pm 30%
Isozimas de creatina cinasa o	MB elevado (presencia a ausencia)
	Valor objetivo \pm 3SD
Creatinina	Valor objetivo \pm 3 mg/L ó \pm 15%
(mayor)	
Glucosa (excluyendo la glucosa (mayor)	Valor objetivo \pm 60 mg/L ó \pm 10%
medida por dispositivos de monitoreo declarados por la FDA para uso doméstico)	
Hierro total	Valor objetivo \pm 20%
Lactato deshidrogenasa (LD)	Valor objetivo \pm 20%
Isoenzimas de LD	LD ₁ /LD ₂ (+ o -), o Valor objetivo \pm 30%
Magnesio	Valor objetivo \pm 25%
Potasio	Valor objetivo \pm 0.5 mmol/L
Sodio	Valor objetivo \pm 4 mmol/L
Proteínas totales	Valor objetivo \pm 10%
Triglicéridos	Valor objetivo \pm 25%
Nitrógeno úrico	Valor objetivo \pm 20 mg/L o + \pm 9% (mayor)



Ácido úrico	Valor objetivo \pm 17%
Compuesto analizado o Prueba aceptable	Criterio para desempeño
<u>Endocrinología</u>	
Cortisol	Valor objetivo \pm 25%
Tiroxina libre	Valor objetivo \pm 3SD
Gonadotropina coriónica humana negativo	Valor objetivo \pm 3SD positivo o
Toma de triyodotironina	Valor objetivo \pm 3SD
Triyodotironina	Valor objetivo \pm 3SD
Hormona estimulante de la tiroides	Valor objetivo \pm 3SD
Tiroxina $\mu\text{g/L}$ (mayor)	Valor objetivo \pm 20% o 10
Compuesto analizado o Prueba desempeño aceptable	Criterio para
<u>Toxicología</u>	
Alcohol en sangre	Valor objetivo \pm 25%
Plomo sanguíneo $\mu\text{g/L}$ (mayor)	Valor objetivo \pm 10% o 40
Carbamacepina	Valor objetivo \pm 25%
Digoxina ng/mL (mayor)	Valor objetivo \pm 20% \pm 0.2
Etosuximida	Valor objetivo \pm 20%
Gentamicina	Valor objetivo \pm 25%
Litio 20% (mayor)	Valor objetivo \pm 0.3 mmol/L \pm
Fenobarbital	Valor objetivo \pm 20%
Fenitoína	Valor objetivo \pm 25%
Primidona	Valor objetivo \pm 25%
Procaïn amida (y metabolito)	Valor objetivo \pm 25%
Quinidina	Valor objetivo \pm 25%
Tobramicina	Valor objetivo \pm 25%
Teofilina	Valor objetivo \pm 25%
Ácido valproico	Valor objetivo \pm 25%
Compuesto analizado o Prueba desempeño aceptable	Criterio para
<u>Hematología</u>	
Identificación celular identificación	90% o el mayor consenso en la
Clasificación de glóbulos blancos porcentaje de en la muestra	Valor objetivo \pm 3SD basado en el tipos diferentes de glóbulos blancos
Conteo de eritrocitos	Valor objetivo \pm 6%
Hematocrito	Valor objetivo \pm 6%
Hemoglobina	Valor objetivo \pm 7%



Conteo de leucocitos	Valor objetivo \pm 15%
Conteo de plaquetas	Valor objetivo \pm 25%
Fibrinógeno	Valor objetivo \pm 20%
Tiempo de tromboplastina parcial	Valor objetivo \pm 15%
Tiempo de protrombina	Valor objetivo \pm 15%

Tabla 21-3. Cálculo de los parámetros de control de calidad.

Prueba/método: Potasio por fotómetro de llama ABC				
Analista: RBP				
Dato de comienzo/finalización: 3/15/93—3/26/93				
Fuente de control y nivel: Control superior, elevado				
Valor objetivo del fabricante: 6.02 mEq/L				
Cómo se determinó: Por método definitivo NRSCL				
Desviación estándar típica del fabricante para el usuario: 0.15 mEq/L				
	Vial 1		Vial 2	
Día	Muestra A	Muestra B	Muestra A	Muestra B
1	6.1	6.1	6.2	5.9
2	6.2	6.2	6.0	6.0
3	5.7	5.8	6.0	6.0
4	5.9	5.8	5.9	5.8
5	6.0	6.0	6.0	6.0
6	5.9	6.0	6.0	6.0
7	5.9	6.0	6.0	6.0
8	5.9	5.8	6.0	5.9
9	6.0	6.1	6.1	6.2
10	6.0	6.1	6.1	6.1
Gran total (suma de todas las observaciones) = 239.7; n = 40 Observaciones.				
Valor objetivo inicial promedio = 239.7/40 = 5.99 mEq/L.				
Desviación estándar temporaria = 0.12 mEq/L.				
<u>Cálculo de los valores objetivo final promedio y la desviación estándar usual (DEU)</u>				
Valor objetivo inicial	Valor objetivo promedio		Desviación estándar	
Día	5.99		0.12 mEq/L	
1° Abril	6.07		0.13 mEq/L	
2 Mayo	6.02		0.11 mEq/L	
3 Junio	6.01		0.13 mEq/L	
Objetivo final promedio = 6.02 (promedio de 5.99, 6.07, 6.02, y 6.01)				
Desviación estándar usual (DEU) = 0.12 mEq/L (promedio de 0.12, 0.13, 0.11, y 0.13)				
Error permitido medicamento = 0.3 mEq/L (establecido por el cuerpo médico Enero 14, 1993)				
Número de DEUs en el error permitido medicamento = 0.3/0.12 = 2.5				
Valor de cambio significativo = 2.8 x DEU = 2.8 x 0.12 = 0.34 mEq/L				



Rango de control elegido es el valor objetivo final promedio ± 2.5 DEU, o $6.02 + 2.5(0.12) = 6.02 + 0.3$ mEq/L, o de 5.72 a 6.32 mEq/L.
Si el rango de control elegido es el valor objetivo final promedio ± 3 USD, el rango = $6.02 + 0.36$, o de 5.66 a 6.38 mEq/L (más alto que los requerimientos médicos).

También hay que tener cuidado cuando el error permitido medicamento contiene menos de 2.5 DE porque la imprecisión puede ser mayor que los cambios requeridos medicamento en los resultados

Tabla 21-4. Comparación de materiales de control de calidad.

Criterio	Congelado	Liofilizado	Líquido a baja temperatura
Costo	Bajo, si no es manipulado* Intermedio, si es manipulado	Alto	Más alto
Claridad	Claro, si se recoge cuidadosamente	Turbio	Claro
Estabilidad meses	12 meses	18 a 24 meses	18 a 24
Validación disponibles de pares	Comparable con materiales medidos con exactitud (NIST y CAP†)	Análisis disponibles de grupos pares fabricantes y regionales, o por el NIST y CAP	Análisis grupos
Error de Liofilización	Ausente	Presente	Ausente
* Esto es, si se agrega un compuesto analizado adicional. † NIST, Instituto Nacional de Estándares y Tecnología; CAP, Colegio de Patólogos Americanos			

Tabla 21-5. Uso de datos de los pacientes en el control de calidad diario.

Número de muestra	Conjunto de paciente A	Conjunto de
-------------------	------------------------	-------------

pacientes B			
Control I	4.4	bajo control	4.4
bajo control			
Control II	6.9	bajo control	6.8
bajo control			
1	3.8		4.1
2	4.6		3.9
3	5.0		5.7
4	4.3		6.1
5	4.2		6.5
6	3.6		5.8
7	4.7		6.4
8	4.0		6.2
9	4.6		5.1
10	3.9		4.7
Control I	4.3	bajo control	4.6
bajo control (en ±2SD)			
Control II	6.8	bajo control	7.0
bajo control (en ±2SD)			
<p>¿ Esperaría usted hasta después de la décima muestra de control de calidad para hacer un juicio del sistema? No, después de obtener la tercer o cuarto muestra de los paciente con un valor sumamente alto o bajo, el control de calidad podría adelantarse y se debería comenzar la detección. Recuerde que ocasionalmente, por casualidad, una serie de especímenes de pacientes muy enfermos puede caer en un orden consecutivo. La prueba repetida resolverá comúnmente el problema.</p>			

Tabla 21-6. Lista parcial de los proveedores aprobados por la HCFA de programas de control de calidad externo para la CLIA'88.

Proveedor	Número de teléfono
Accutest	800-356-6788
Academia Americana de Médicos de Familia	800-274-2237
Asociación Americana para el Bioanalista	800-234-5315
Asociación Americana de Pediatras	800-433-9016
Asociación Osteopática Americana	800-621-1773
Instituto de Control Externo Americano	



800-333-0958
Sociedad Americana de Medicina Interna
800-338-2746
Sociedad Torácica Americana
212-315-8789
Sociedad Torácica de California
714-730-1944
Colegio de Patólogos Americanos
800-323-4040
Colegio de Patólogos Americanos/ Encuestas
800-323-4040
Estado de Pennsylvania
215-363-8500
Estado de Puerto Rico
809-764-6945
Fundación Investigadora Biométrica del Pacífico
206-233-9151
Estado de Idaho
208-334-2235
Estado de New Jersey
609-530-6172
Estado de New York
518-474-8739
Estado de Ohio
614-466-2278
Instituto de Investigación Solomon Park
206-821-7005
Laboratorio de Higiene del Estado de Wisconsin
800-462-5261

HCFA, Administración Financiera de Atención a la Salud
De: la Asociación Americana para la Química Clínica, Clinical
Laboratories
Improvement Act, Fax n°. 800-254-2329

Tabla 21-7. Métodos definitivos y de referencia por el NRSCL.

Número de documento	Compuesto analizado
Métodos definitivos	
NCCLS RS1-A	Glucosa
NCCLS RS3-A	Colesterol
NCCLS RS7-P	Sodio
NCCLS RS8-P	Potasio
NCCLS RS9-P	Calcio
NCCLS RS10-P	Cloruro
NCCLS RS11-P	Urea
Métodos de referencia	



	NCCLS RS1-A	Glucosa
	NCCLS RS2-A	Aspartato
	aminotransferasa	(ASAT)
	NCCLS RS3-A	Colesterol
	NCCLS RS4-A	Alanina aminotransferasa (SESgo)
	NCCLS RS5-A	Proteínas totales
	NCCLS RS6-A	Bilirrubina tota
	NCCLS RS7-P	Sodio
	NCCLS RS8-P	Potasio
	NCCLS RS9-P	Calcio
	NCCLS RS10-P	Cloruro
	NCCLS RS11-P	Urea
	NCCLS RS12-P	Creatinina*
	NCCLS RS13-P	Anticuerpo para rubeola
	NCCLS RS14-P	Creatina cinasa
	NCCLS RS15-P	Hemoglobina*
	NCCLS RS16	Prueba de susceptibilidad antimicrobiana
	NCCLS RS17	Gama-glutamyl transferasa
	NCCLS RS18	Ácido úrico*
<i>NRSCL</i> , Sistema de Referencia Nacional para el Laboratorio Clínico. A, Aprobado; P, propuesto. *, En desarrollo.		

Figuras

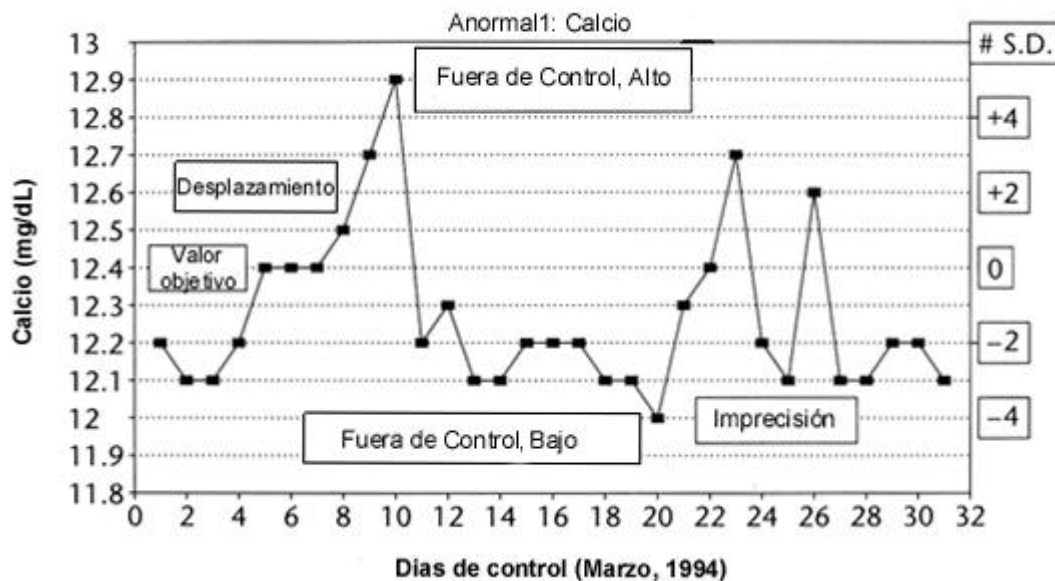


Figura 21-1 Gráfica de los valores de control de calidad de Levey-Jennings. Acciones de control de calidad (documentación del personal de prueba de cómo fueron resueltos todos los valores fuera de control): Los días 5-7 representan un desplazamiento del valor objetivo (vigilar cuidadosamente). Los días 6-10 muestran una tendencia gradual hacia valores mayores. El día 10 los resultados de los pacientes no se informaron, un problema no resuelto (un control >3 DE), probablemente necesita un nuevo calibrador. En el día 11 se recalibró usando un nuevo frasco de calibrador. Los valores controles están ahora en el rango de control; fueron reanalizadas las muestras de los pacientes desde el día 9. En el día 13 comienza un cambio hacia valores menores. Este cambio fue investigado en el día 20 cuando un control dio más bajo que 3 DE. La recalibración en el día 21 resolvió el problema porque los valores eran más cercanos al valor objetivo. A lo largo de los días 23 al 26 se incrementó la imprecisión. En el día 27 la limpieza del flujo de células resolvió el problema, sin embargo, el sesgo bajo está aún presente. Nota general: Cuando este método muestra una imprecisión aceptable, los valores están cerca del objetivo. Fue subsecuentemente determinado que el valor objetivo del fabricante para la fuente de CC era inexacto. Los resultados de la prueba del programa de control externo realizados el 16 de Marzo estaban dentro de 0.01 mg/dL del valor objetivo de todos los participantes. Después de esta documentación, el director del laboratorio aprobó un nuevo valor objetivo para esta fuente de CC.

CONTROL DE CALIDAD DIARIO

Fecha: _____
Operador: _____

Nivel I

Sec. #	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
105																	
<u>Glu</u>	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
89																	
22																	⊗
<u>BUN</u>	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
20																	
18																	
147																	
<u>Na⁺</u>	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
145																	
143	⊗																⊗
6,3																	
<u>K⁺</u>	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
6,1																	
5,9																	
41																	⊗
<u>CO₂</u>	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
37																	
33																	
112																	
<u>Cl</u>	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
110																	
108																	

Nivel II

Sec. #	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
224																	
<u>Glu</u>	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
218																	
212																	
51																	⊗
<u>BUN</u>	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
49																	
47																	
127																	
<u>Na⁺</u>	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
125																	
123	⊗																⊗
3,5																	
<u>K⁺</u>	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
3,3																	
3,1																	
18																	⊗
<u>CO₂</u>	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
16																	
14																	
93																	
<u>Cl</u>	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
91																	
89																	

⊗ FUERA de control - decisión tomada:
Recalibración

Figura 21-2 Registro de verificación de control de calidad diario para múltiples compuestos analizados. A medida que cada control se informa, se registra rápidamente en una hoja de datos. Se incluyen las notas de los valores fuera de control y la acción tomada. Un valor diario para el cálculo de control de calidad es seleccionado mediante el uso de una tabla básica de números aleatorios. (Formato desarrollado por Rosvoll RV: En Copeland BE, Rosvoll RV, Casella JM: *Quality control workshop manual*, Chicago, 1978, American Society of Clinical Pathologists Commissions on Continuing Education).

CAPÍTULO 22

22. Evaluación de Métodos

Carl C. Garber

R. Neil Carey

Propósito de la evaluación de métodos



Requisitos de los laboratorios

Requisitos de los fabricantes

Requisitos médicos

Patrones de rendimiento basados en las pruebas de competencia

Selección de métodos

Evaluación de la necesidad

Características de aplicación

Características metodológicas

Características de rendimiento analíticas

Evaluación de un método por el laboratorio

Familiarización

Estabilidad

Linealidad

Errores aleatorios y sistemáticos

Experimentos para evaluar la magnitud de errores específicos

Error aleatorio calculado a partir de estudios de replicación

Error constante calculado a partir de estudios de interferencia

Error proporcional calculado a partir de experimentos de recuperación

Experimentos para la evaluación final

Experimentos de replicación intra-días

Experimentos de comparación de métodos

Evaluación del error total

Criterios para los intervalos de confianza para juzgar el rendimiento analítico

Criterios para el intervalo de confianza para el error aleatorio

Criterios para el intervalo de confianza para el error constante

Criterios para el intervalo de confianza para el error proporcional

Criterios para el intervalo de confianza para el error sistemático

Criterios para el intervalo de confianza para el error total

Otros protocolos de evaluación y sistemas para el análisis de datos

Discusión

**Ejemplo de cálculos y toma de decisiones para un estudio de
evaluación de rendimiento para la glucosa**

OBJETIVOS

- ♦ Citar tres propósitos de la evaluación de métodos
- ♦ Citar los aspectos que se deben considerar cuando se selecciona



un método para evaluar con el fin de usarlo en el laboratorio de química clínica.

- ♦ Hacer la diferencia entre los errores aleatorios, constantes, proporcional y totales.

Términos Clave

error La diferencia entre el estimado único de una cantidad y su valor verdadero. Si no se encuentra disponible un estimado bueno del valor verdadero, se deberá expresar la diferencia como la desviación del valor asignado. [ref\(392\)](#)

error analítico aleatorio (RE) Un error ya sea positivo o negativo cuya dirección y magnitud exacta no se puede predecir: imprecisión. [ref\(393\)](#)

error analítico sistemático Un error que siempre se causa en la misma dirección: inexactitud. [ref\(394\)](#)

error constante sistemático (EC) Un error cometido siempre en la misma dirección y de la misma magnitud, inclusive en la medida en que la concentración de los compuestos analizados cambia. [ref\(395\)](#)

error estándar del estimado La desviación estándar de las diferencias $S_{y,x}$, entre los valores observados y , y los valores y predichos por la línea de regresión para una x dada. Este valor estadístico mide la dispersión de los datos alrededor de la línea de regresión.

error permisible (E_A) La cantidad de error que se puede tolerar sin invalidar la utilidad médica del resultado analítico, o la cantidad máxima de error definida por el rendimiento exitoso en las pruebas de competencia. [ref\(396\)](#)

error sistemático proporcional (EP) Un error que se causa siempre en la misma dirección y la magnitud del cual es un porcentaje del compuesto analizado que se mide. [ref\(397\)](#)

error total (TE) Una combinación de los errores analíticos sistemáticos y aleatorios; un estimativo de la magnitud del error que puede ocurrir en una medición única.

exactitud La concordancia entre el estimado promedio de una cantidad y su valor verdadero. [ref\(398\)](#)

experimento de comparación de métodos Un experimento de evaluación en el cual una serie de muestras de pacientes es analizada tanto por el método de prueba como por el método comparativo. Los resultados son evaluados con el fin de determinar si existen diferencias entre los dos métodos. [refs\(399\)](#)

experimento de interferencia Un experimento de evaluación usado para calcular el error sistemático de un método como resultado de interferencias o falta de especificidad. [refs\(400\)](#)

experimento de recuperación Un experimento de evaluación que calcula el error sistemático proporcional. [ref\(401\)](#) La cantidad del compuesto analizado recuperado se divide por la cantidad añadido a la muestra y la relación se expresa como un porcentaje de recuperación. La desviación de 100% del porcentaje de recuperación es el error proporcional.



- experimento de replicación** Un experimento de evaluación que calcula el error analítico aleatorio. [ref\(402\)](#) Las mediciones se hacen en alícuotas de una muestra estable en períodos específicos de tiempo, como por ejemplo, entre la misma corrida, en el mismo día, o en un período de varios días.
- imprecisión** La desviación estándar o el coeficiente de variación de los resultados en un conjunto de mediciones repetidas. Se debe establecer el valor promedio y el número de repeticiones así como el tipo particular de imprecisión, como entre-laboratorios, intra-día, o imprecisión entre-días. [ref\(403\)](#)
- inexactitud** El error sistemático calculado por la diferencia entre el promedio de un conjunto de datos y el valor verdadero conocido o calculado por otros medios.
- interferencia** El efecto de cualquier componente de la muestra en la exactitud de la medición del compuesto analizado deseado. [ref\(404\)](#)
- intervalo de confianza** El intervalo numérico que contiene el parámetro de la población con una probabilidad especificada.
- intervalo reportable** El intervalo de concentración de un método en el cual se ha determinado el rendimiento analítico (o sea, la imprecisión y la inexactitud) y se ha juzgado que cumple con los requisitos de aplicación médica.
- método comparativo** El método analítico contra el cual se compara el método de prueba en el experimento de comparación de métodos. El término no hace ninguna inferencia sobre la calidad del método comparativo. [ref\(405\)](#)
- método de prueba** En este capítulo el método que se escoge para la evaluación experimental o estudio mediante la evaluación de métodos. [ref\(406\)](#)
- muestra** La parte apropiadamente representativa de un espécimen usado para el análisis. La muestra debería ser llamada una muestra de prueba cuando sea necesario evitar confusiones con el término *estadístico muestra al azar de una población*. [ref\(407\)](#)
- nivel de decisión médica (X_c)** Una concentración del compuesto analizado a la cual está indicada alguna acción médica para un cuidado adecuado del paciente. Puede haber varios niveles de decisión médica para un analítico dado.
- parámetro** Un número que describe una característica de la población. Esto en contraste a una estadística la cual es un estimativo de un parámetro derivada de una muestra de la población.
- precisión** La concordancia entre mediciones repetidas. [ref\(408\)](#)
- pruebas de aptitud** Un programa en el cual se envían muestras con periodicidad a los laboratorios para ser analizadas con el propósito de evaluar el rendimiento con respecto a valores blanco definidos, establecidos por métodos de referencia, o por grupos de pares según se considere más apropiado. Se requiere la participación en pruebas de aptitud bajo la CLIA '88. [ref\(409\)](#)
- regresión lineal** Un sistema usado para escoger una sola línea a través de una serie de datos que describe “mejor” la relación entre los dos subconjuntos o los dos métodos. Este tipo de sistema se puede usar asumiendo que no hay errores en los datos del método X. (Ver también capítulo 19, Estadísticas del Laboratorio.)



sesgo Un componente sistemático del error analítico, calculado a partir del experimento de comparación de métodos.^{ref(410)} Se conoce también como la diferencia entre dos cantidades. Es una medida de inexactitud.

valor asignado El valor asignado ya sea arbitrariamente (o por convención) o a partir de evidencia preliminar (en el caso de la ausencia de un método de referencia reconocido).^{ref(411)}

valor ideal El valor de un parámetro bajo condiciones sin error.

valor real Un término que se considera que tiene significado evidente y que no requiere definición. En la práctica, el valor verdadero se aproxima mucho al valor (del método) definitivo, y un poco menos al valor (del método) de referencia.^{ref(412)}

varianza El cuadrado de la desviación estándar.

A través de las últimas décadas los métodos analíticos cuantitativos usados en los laboratorios clínicos se han vuelto más confiables y más estandarizados. La mayoría de los procedimientos analíticos son suministrados por fabricantes comerciales. El énfasis de los químicos clínicos hospitalarios ha cambiado del desarrollo de métodos a la selección y evaluación de aquellos métodos comercialmente disponibles, que se adapten mejor a la situación de ese laboratorio en particular. Desde la implementación de la Ley para el Mejoramiento de los Laboratorios Clínicos de 1988^{ref(413)} (CLIA '88), el proceso de evaluación y selección ha tomado un significado más serio puesto que las reglamentaciones requieren, entre otras cosas, un rendimiento exitoso en las pruebas de aptitud con el fin de que el laboratorio pueda continuar realizando pruebas en esa especialidad, subespecialidad, o procedimiento de prueba.

El proceso de evaluación de los métodos ha evolucionado.^{ref(414)} Para ello es crítico reconocer que el rendimiento puede ser juzgado objetivamente como aceptable sólo si los errores son suficientemente pequeños para tener un uso médico aceptable. Los protocolos diseñados por Westgard y asociados^{ref(415)} y el Comité para los Estándares del Laboratorio Clínico (NCCLS)^{refs(416) refs(417)} miden el error en términos de las unidades de concentración del compuesto analizado pero presentan criterios diferentes para la evaluación del error. El enfoque de Westgard y asociados es de administración de calidad e incluyen un presupuesto para la operación del procedimiento del control de calidad cuando comparan los resultados obtenidos del error al error médicamente permisible. Los protocolos del NCCLS dan procedimientos para comparar los errores observados ya sea con los datos suministrados por el fabricante, o con el error permisible especificado en términos de un parámetro estadístico (como la desviación estándar permisible o el sesgo permisible). Sin embargo, existe otra fuente de requisitos de rendimiento como son los establecidos en CLIA '88 para las pruebas de aptitud. Discutimos cada uno de estos sistemas: aceptación desde el punto de vista de la necesidad médica, el significado estadístico, y el punto de vista de las pruebas de aptitud.

Propósito de la Evaluación de Métodos

Requisitos del laboratorio



Los nuevos métodos analíticos se desarrollan con el fin de mejorar la exactitud y la precisión de los métodos existentes, con el fin de permitir la automatización, para reducir los costos de los reactivos o de la mano de obra, o para medir un compuesto nuevo. En cualquier caso, se debe verificar experimentalmente el rendimiento analítico en el laboratorio clínico mismo, aun si se cree que el método nuevo es una mejora con respecto a los métodos anteriores. La extensión de los experimentos y la interpretación de los datos van a depender del propósito de la evaluación y de quien la realiza, pero el fundamento básico y el diseño experimental son similares en todas las evaluaciones. Las reglamentaciones federales CLIA '88^{ref(418)} expuestas en la Subparte K, sección 493.1213 dan los requisitos específicos para realizar la evaluación de métodos antes de usar el método para reportar los resultados de los pacientes, independientemente de las razones científicas y médicas para realizar el procedimiento. Sin embargo, en la sección 493.1202 se colocó un artículo temporal desde Septiembre 1, 1992 (día en que empezó a regir CLIA '88) hasta Septiembre 1, 1994, período durante el cual si el laboratorio seguía las instrucciones del fabricante de manera exacta, se podían usar algunos de los métodos basados en los datos de rendimiento suministrados por el fabricante. Este período temporal ha sido extendido por dos años más. Sin embargo, las reglamentaciones estatales o locales con requisitos más específicos derogan las reglas federales de CLIA '88.

El proceso de evaluar un método es distinto del proceso rutinario para el control de calidad, después de haber sido introducido en la rutina diaria. El control de calidad rutinario (diario) (ver Capítulo 21) es un proceso establecido con el fin de detectar los incrementos en los errores analíticos de un método con el fin de evitar la liberación de datos incorrectos de los pacientes. El control de calidad rutinario detecta los errores sólo cuando estos son superiores a los errores presentes en el momento que se establecieron los intervalos para los controles. El uso del control de calidad rutinario no le permite al investigador determinar la magnitud de los errores inherentes del método o de decidir si son aceptables. Se requieren los experimentos de evaluación de métodos para establecer los errores analíticos inherentes del método y relacionarlos con los requisitos médicos o reglamentarios.

Requisitos del fabricante

La Administración de Drogas y Alimentos (FDA) requiere que los fabricantes indiquen el rendimiento analítico del método, en especial acerca de su exactitud y precisión cuando un fabricante desarrolla un método nuevo y se prepara a mercaderarlo.^{ref(419)} Además la regla final en CLIA '88 requiere que la FDA evalúe si los datos del fabricante cumplen con los requisitos de CLIA '88 para el control general de calidad.^{ref(420)} Todas las aseveraciones deben estar soportadas por datos experimentales de evaluación de métodos. Es esencial que estas aseveraciones sean reales y conservadoras. El nivel del rendimiento del método en la mayoría de los laboratorios debe ser por lo menos tan buena como lo dice el fabricante. Sin embargo, los clientes potenciales comparan con frecuencia aseveraciones hechas por diferentes fabricantes cuando seleccionan los métodos y por consiguiente las aseveraciones deben ser competitivas. Se requieren datos experimentales extensivos, por parte del fabricante, con el fin de desarrollar aseveraciones que se puedan defender. Los protocolos propuestos por la NCCLS han sido modificados por los fabricantes con el fin de permitirles producir aseveraciones de rendimiento defendibles que pueden ser verificadas en el laboratorio.

La mayoría de las evaluaciones de métodos son realizadas por personal del laboratorio



en los hospitales y laboratorios comerciales. Estas evaluaciones se hacen con el fin de determinar si el rendimiento del método cumple, primariamente con los requisitos de aplicación médica dispuestas para el usuario y, secundariamente las metas de calidad especificadas por CLIA '88 para tener un rendimiento exitoso en las pruebas de aptitud. El método puede ser un método comercial, un método “desarrollado en casa”, o un método que el usuario ha visto en la literatura y lo quiere establecer en su laboratorio. Se requiere que el usuario realice la evaluación tan eficientemente como sea posible y que determine con un mínimo de trabajo experimental si el rendimiento del método es inaceptable. En ese caso, el usuario puede rechazar el método sin realizar todos los estudios que requieren mucho tiempo, que hubieran sido requeridos para aceptarlo.

Requisitos médicos (ver también el capítulo 21)

La decisión de aceptar o rechazar un método posible para el laboratorio se debe basar en la capacidad del método para cumplir con los requisitos del usuario final, el médico que es quien usa los resultados de la prueba del laboratorio para el cuidado de los pacientes. El error del resultado es excesivo si provoca un diagnóstico equivocado. La mayor posibilidad de tener un diagnóstico erróneo ocurre debido a un error analítico de la prueba a la concentración a la cual el médico toma una decisión; esta concentración se conoce como la *concentración del nivel de decisión médico*. Por ejemplo, una concentración de glucosa en ayunas inferior a 500 mg/L puede ser diagnóstica de hipoglicemia.^{ref(421)} Para cada concentración de nivel de decisión se deben formular estándares de rendimiento consistente en la concentración de nivel de decisión, X_C y el error permisible, E_A . El error permisible se establece en unidades de concentración de tal manera que los errores en el método de prueba puedan ser juzgados comparándolos con el error clínicamente permisible. Los datos de los métodos de evaluación son interpretados usando los datos para calcular el error del método al nivel de concentración de decisión médica, y después comparando este cálculo con el error permisible. Si el error del método es mayor es mayor que el error permisible, el rendimiento no es aceptable. Si el error es menor que el error permisible, el rendimiento es aceptable.

La cantidad de error presente en una sola medición del compuesto analizado es diferente para cada vez que se mide debido a que una porción del error es simplemente al azar. Por consiguiente la magnitud del error de una medición para la muestra de un paciente dado, no se puede conocer exactamente y no se puede predecir el error máximo absoluto que el método puede provocar en el análisis de la muestra de un solo paciente. Sin embargo, se puede calcular una estimación del nivel superior del error de tal manera que sólo haya una posibilidad del 5% o del 1% de que el error actual sea mayor que el límite superior. De tal manera se puede definir el error permisible como el 95% o el 99% del límite superior del error. Sólo habrá una posibilidad del 5% o del 1% de que el error sea mayor que esta cantidad definida y pueda causar un diagnóstico equivocado.

Para la mayoría de los compuestos analizados no se han definido los patrones de rendimiento basados en criterios médicos. Se han propuesto patrones de rendimiento para aquellos compuestos que se miden con mayor frecuencia, pero generalmente se debe usar el juicio profesional propio y los comentarios de los clínicos para establecer un patrón de rendimiento para un compuesto analizado en particular.^{refs(422)} Barnett presentó un resumen de desviaciones estándar médicamente permisibles. Tonks^{ref(423)} propuso que el error permisible



sea el menor valor entre un cuarto del intervalo de referencia o el 10%. Para las enzimas el límite se expande hasta el 20%.^{ref(424)} Entre otras fuentes se puede incluir las recomendaciones de Gilbert^{ref(425)} para el sesgo permisible y la desviación estándar permisible y las recomendaciones de Cotlove et al.^{ref(426)} para la “variación tolerable analítica” basada en la mitad de la variación biológica e individual.

La Sesión de Aspen^{ref(427)} patrocinada por el CAP también recomendó el uso de variaciones biológicas intraindividuales e interindividuales con el fin de determinar los objetivos de precisión de un método usado para las pruebas de grupos. El coeficiente de variación analítica se denota como CV_A , donde

$$CV_A = \frac{1}{2} \sqrt{CV_{Intra}^2 + CV_{Inter}^2} \quad Ec. 22-1$$

y CV_{Intra} es la variación biológica observada dentro de un individuo y CV_{Inter} es la variación biológica observada entre individuos.^{ref(428)} Con el fin de permitir al médico el seguimiento los cambios individuales, el método debe ser aun más preciso:

$$CV_A = \frac{1}{2} CV_{Intra} \quad Ec. 22-2$$

Fraser et al.^{refs(429)} revisaron varias formas que han usado para establecer las metas de calidad, y han concluido que la variación biológica debe ser una consideración clave cuando se establecen errores permisibles para la mayoría de los compuestos analizados, mientras que para las drogas terapéuticas las metas de calidad se basaron en la teoría farmacocinética.

Otros factores como el tiempo que media entre la recolección de la muestra y la obtención del resultado, afectan el error médicamente permisible. Los médicos pueden aceptar, a veces, un mayor error si dicho tiempo es breve.

Estándares de desempeño basados en pruebas de aptitud

Otra fuente de patrones de rendimiento es la especificación contenida en CLIA '88 para las pruebas de aptitud.^{ref(430)} El laboratorio no debe considerar los requisitos médicos sino que también debe seleccionar, evaluar y luego monitorear (mediante un control de calidad estadístico, ver Capítulos 19 y 21) el método de análisis de tal manera que cuando el método sea incluido en la rutina diaria se tendrá confianza en que el método podrá cumplir con los requisitos de las pruebas de aptitud. Estos requisitos se dan como (1) límites fijos, como el límite absoluto de la cantidad de variabilidad o un límite expresado como un porcentaje fijo de la concentración o actividad, o como (2) límites de tres desviaciones estándar basados en la desviación estándar de grupos comparables o (3) dentro de \pm dos diluciones del número blanco de diluciones (títulos) para análisis reportados en función del número de diluciones necesarias para titular una muestra positiva hasta obtener una lectura negativa (o sea, el título). Se ha demostrado^{ref(431)} que si la precisión interna del laboratorio es un tercio de los criterios fijos límites y que si el sesgo del análisis es “pequeño”, la posibilidad de pasar la prueba de aptitud es mayor del 99%. Otro análisis del asunto^{ref(432)} indica que el sesgo + 4DS del análisis debe ser menor que el límite especificado. En la práctica esto indica que la DE interna debe ser menor a 25% del límite fijo, o menor que un cuarto de un límite de 3DS (esto

quiere decir menor de tres cuartos de la DE del grupo similar). Decir que la DE interna debe ser tres cuartos de la DE del grupo no es del todo irreal. La Tabla 22-1 da una lista de los requisitos de aptitud para las pruebas según CLIA '88. La quinta columna muestra la DE máxima permisible dentro del laboratorio (usando un criterio de 4DS y un sesgo de cero). Por comparación las recomendaciones de Fraser et al. [refs\(433\)](#) en cuanto a las DE internas máximas se incluyen también. Observe que en algunos casos las DE son bastante similares mientras que en otros son bastante diferentes. Un método de laboratorio debe poder pasar las pruebas de aptitud y también suministrar resultados útiles de las pruebas. Para una comparación adicional de los errores médicos, de prueba y de aptitud ver la pág.385.

Selección de Métodos

Evaluación de necesidades

La calidad del servicio prestado por el laboratorio se establece mediante la selección de personal, equipos y métodos analíticos. La Fig. 22-1 ilustra las numerosas consideraciones involucradas en el proceso de selección de métodos. A menos que el proceso esté bien organizado, la selección de métodos puede ser una experiencia traumática y costosa. La cuadro izquierda en la p.407 suministra una secuencia lógica para seguir en la selección de métodos.

Con frecuencia, la decisión de establecer un método instrumento nuevo está basada en un requerimiento médico o económico de una prueba nueva que debe ser proporcionada por el laboratorio. Un cambio en la metodología de una prueba puede ser dictado también por los progresos en la práctica de laboratorio. Por ejemplo, en años recientes muchos laboratorios han cambiado sus inmunoensayos de reactivos con marcación isotópica a reactivos no isotópicos con el fin de reducir o eliminar procedimientos especiales requeridos para manejar materiales radioactivos y aprovechar el mayor período de almacenamiento de los reactivos más La edad y falta de confiabilidad operacional del método actual también pueden dictar la necesidad de un método nuevo.

Etapas en el Proceso de Selección
Determine la necesidad
Defina los requerimientos
Aplicación
Metodológicos
Rendimiento
Revise la literatura
Seleccione los posibles métodos

Características de aplicación

Una vez determinada la necesidad de un método nuevo se definen todas las características prácticas requeridas del método. Estas se denominan *características de aplicación* (ver el cuadro derecho en la pág. 407). Se hace énfasis en el tamaño de la muestra para aplicaciones pediátricas, velocidad de obtención de resultados, posibilidades de interrupción para aplicaciones de urgencia, y en el número de pruebas para aplicaciones de tamizaje con



volúmenes altos. El posible método debe cumplir esencialmente con estos requisitos fundamentales para considerarlo más a fondo.

Se ha definido el *costo por prueba* como una característica de aplicación. Este aspecto también puede ser considerado por separado en virtud del énfasis actual en la necesidad de reducir los costos. Cuando se comparan los métodos posibles se deben considerar los factores que afectan los costos directos. Esto incluye el costo de depreciación del capital, reactivos (incluyendo el agua para muchos analizadores), y suministros, costo del servicio de reparación y mantenimiento, costo de la interfase para la computadora y costo de la mano de obra. La mayoría de esta información la colocan los fabricantes a disposición incluyendo el costo inicial del equipo, el consumo calculado de reactivos y suministros y su costo, la productividad calculada y el costo del mantenimiento (por contrato o por visita). Otro tipo de información está disponible dentro del mismo laboratorio tal como la carga de trabajo esperada y las modificaciones anticipadas de productividad sobre la base de los procedimientos de control de calidad interno. Para obtener un estimado inicial de los costos directos de mano de obra, se pueden utilizar las unidades de registro de carga de trabajo del CAP. Los usuarios deben ajustar esta información a su propia situación y las necesidades del laboratorio. El ejemplo del cuadro en la p.409 ilustra como se puede combinar esta información para obtener el costo directo total por prueba. El mayor costo es la mano de obra con un 84% del total. Si el laboratorio desea añadir pruebas nuevas con el fin de disminuir el costo general, se deben seleccionar aquellas pruebas con el componente más bajo de mano de obra.

Características de Aplicación
Tamaño de la muestra
Tiempo de respuesta
Velocidad del procesamiento de las muestras
Tipo de muestra
Calibración automática
Revisión inmediata del control de calidad
Auto-diagnóstico
Requisitos de espacio en el laboratorio
Requisitos para el almacenamiento de los reactivos
Disponibilidad y destreza del personal del laboratorio
Tiempo disponible para el entrenamiento
Costo por prueba
Peligros de seguridad y ambientales

Cálculo de los Costos Directos
<u>Información del laboratorio</u>
80000 pruebas de pacientes (muestras) por año.
Rendimiento estimado de las pruebas del 50% (muestras, control de calidad, repeticiones diluciones, reparaciones).
16,000: número total de análisis
4 unidades CNP por muestra = 64.000 unidades en total

5 años depreciación del capital
US \$750: costos de instalación (cambio en las instalaciones del laboratorio)
<u>Información del fabricante</u>
US \$11,000: costo del equipo
US \$1,200: costo de materiales y reactivos (para 16,000 análisis)
US \$1,100: contrato de mantenimiento (dos visitas)
US \$500: repuestos para el equipo.
<u>Cálculo de los costos del equipo</u>
Capital e instalación: US \$11,750 / 5 años = US \$2,350/año / 8000
= US \$0.294/muestra
Servicio y reparaciones: US \$1,100 + US \$500 = US \$1,600/año / 8000
= US\$0,20/muestra
Subtotal = US \$0.494/muestra
<u>Cálculos de costos de mano de obra (asuma US \$25.00/hora incluyendo beneficios</u>
$[(64,000 \text{ unidades CNP} / 60 \text{ unidades/hora}) \times \text{US\$25/hora}] / 8000$
muestras = US \$3.333/muestra
<u>Cálculos de los costos de los reactivos</u>
US \$1,200.00 / 8000 muestras = US \$0.15/muestra
<u>Costos directos totales</u> = US \$3.977/muestra

Características del método

El paso siguiente en el proceso de selección es la definición de las características metodológicas ideales que permitirán que el método seleccionado tenga buena probabilidad de éxito en el laboratorio. Estas características incluyen metodología preferida, que tendrá potencialmente la especificidad química necesaria, (libre de interferencias) y sensibilidad química (capacidad de detectar cantidades pequeñas o pequeños cambios en la concentración del compuesto analizado). También es importante la capacidad de usar estándares acuosos para calibrar (libertad de efectos de matriz). La elección de reactivos, temperatura, tiempo de reacción tiempo de reacción, tiempo de medición y tipo de medición (como métodos de determinación de un punto, dos puntos o cinéticos), son características de un método que deben definirse. El NCCLS ha desarrollado una fuente de principios recomendados para métodos empleados en química clínica (NRSCL).[ref\(434\)](#)

Características del desempeño analíticas

También se debe definir el método en términos de su capacidad de rendimiento analítico. Las metas globales de rendimiento han sido discutidas en términos del error permisible con base en la aplicación médica de la prueba y los requisitos de las pruebas de aptitud. Se deben definir otros aspectos del rendimiento como el intervalo de utilización del método (*intervalo reportable*, la cual puede ser o no ser igual al intervalo lineal), estabilidad de los reactivos y materiales de calibración, capacidad del analizador de detectar el consumo de reactivos en el caso de sustratos enzimáticos, intervalo de referencia esperado, cantidad de error causado por las sustancias interferentes, precisión (dentro de las corridas, entre las corridas, entre días y total) y exactitud del método (determinada por la comparación de los resultados con los obtenidos por un método de referencia o estándar). El fabricante está obligado a suministrar



información sobre la precisión y la exactitud. Sin embargo, es esencial que el método sea evaluado experimentalmente para determinar si su rendimiento en el laboratorio del usuario es suficientemente bueno para cumplir con las necesidades de aplicación médica en la institución del usuario. Las indicaciones del fabricante sobre el rendimiento deben considerarse únicamente como un punto de partida para determinar el rendimiento real en el laboratorio.

A continuación, se debe revisar la literatura técnica y profesional y los datos de las pruebas de aptitud para determinar los métodos disponibles y obtener algún tipo de información acerca de sus características de aplicación, metodológicas y de rendimiento. También es útil consultar con colegas sobre sus experiencias y recomendaciones.

La etapa final en el proceso de selección implica reunir toda la información con el fin de llegar a una elección final. El uso de un esquema de clasificación numérica permite obtener una apreciación global más objetiva de los métodos en estudio.^{refs(435)} Se puede adaptar el esquema clasificación numérica mediante el uso de sistemas de ponderación para las características más importantes. La selección final puede incluir varios métodos posibles que cumplen con los criterios deseados. Se pueden someter posteriormente los métodos al proceso de evaluación que se describe a continuación con el fin de escoger el método con las mejores características de rendimiento.

Evaluación de un Método de Laboratorio

Por lo general, el estudio de evaluación de métodos no se hace para probar todos los métodos con el fin de determinar cual es el método con el menor error, sino para establecer si el método seleccionado tiene errores analíticos aceptablemente pequeños. El proceso de evaluación de métodos implica un cálculo de la magnitud del error analítico para una muestra de un paciente. Se escogen los experimentos de laboratorio a realizar para calcular el error, porque dan valores cuantitativos de los errores aleatorios y sistemáticos con un mínimo de trabajo experimental. Sin embargo, los cálculos obtenidos pueden no ser válidos si están basados en ciertas presunciones que no son verdaderas. Estas presunciones incluyen la familiaridad del operador con el procedimiento del método; la estabilidad de los calibradores, controles y reactivos; y la linealidad de la respuesta a través de todo el intervalo de trabajo.

Familiarización

Es esencial que los operadores del método se familiaricen completamente con los detalles del método y la forma de operar el instrumento, antes de recopilar datos que serán utilizados para caracterizar el rendimiento del equipo. Este proceso de familiarización ha sido tenido en cuenta por la NCCLS^{refs(436) refs(437)} y puede incluir el entrenamiento por cuenta del fabricante. Debe tener una duración suficiente de tal manera que al terminarlo se puedan realizar todos los aspectos de la operación del método o instrumento de una manera confortable. Obviamente el período necesario para la familiarización varía según la complejidad del método o analizador.

Estabilidad

La verificación de la estabilidad de los reactivos, calibradores y materiales de control, especialmente los preparados en el laboratorio, puede ser un proceso dispendioso. El asunto se simplifica considerablemente para los materiales preparados comercialmente. Se puede usar la fecha de expiración durante la evaluación de los métodos debido a que los problemas de

estabilidad serios serán detectados ya que se presentará un rendimiento analítico inaceptable del método. Para los reactivos preparados en el laboratorio es necesario documentar esas características. Se deben realizar estudios preliminares con análisis cruzados comparando los resultados de las muestras de los pacientes analizadas usando calibradores frescos y calibradores viejos, con el fin de ensayar la estabilidad de los calibradores. Esto se debe hacer varias veces y se deben promediar las diferencias para cada edad específica del calibrador con el fin de reducir los efectos de preparaciones diferentes. Similarmente, se puede ensayar la estabilidad de los reactivos preparando periódicamente (diario, semanal o mensual, dependiendo de la velocidad prevista de deterioro) reactivos nuevos y ensayándolos contra los reactivos más viejos, analizando muestras de pacientes con las dos configuraciones de reactivos. Los reactivos más viejos deben ser almacenados bajo condiciones específicas para las mediciones posteriores. Se pueden comprobar las diferencias observadas entre los reactivos nuevos y viejos usando la prueba t (ver p.413).

Linealidad

La Federación Internacional de Química Clínica ha definido el intervalo analítico de una forma cualitativa, estableciendo que es el “intervalo de concentración o de otra cantidad de la muestra en el cual el método es aplicable sin modificación”^{ref(438)} Las reglamentaciones expuestas en CLIA '88 no requieren explícitamente que se haga un experimento de linealidad sino más bien que se haga una discusión sobre la “verificación” del *intervalo reportable* (ver Sección 493.1217), que es el intervalo definido por el valor mínimo (o cero) y el valor máximo del material de calibración. Cuando se estudian experimentalmente los límites de linealidad, se deben incluir en los intervalos de concentración los límites asegurados por el fabricante. El número mínimo absoluto de concentraciones diferentes que se deben medir es tres. Se deben hacer mediciones por duplicado para cada concentración de muestra.

Se puede hacer un estudio inicial de linealidad usando estándares acuosos para identificar la capacidad del método con una matriz de muestra ideal. Se debe seguir con el análisis de una serie de diluciones de la muestra con el compuesto analizado conteniendo la matriz biológica,^{ref(439)} como suero u orina, usados para las pruebas en los pacientes. Se obtendrá información importante sobre la influencia de la matriz biológica del método con las muestras acuosas y de matriz biológica. Puede ser difícil preparar muestras en una matriz biológica con un intervalo de concentraciones analíticas desde cero hasta el límite de linealidad. Para los compuestos analizados que no se encuentran presentes normalmente en la matriz, como las drogas, se añade simplemente el compuesto analizado a una muestra libre de éste para obtener la concentración máxima deseada, y se prepara una serie de diluciones usando suero u orina libre de compuesto analizado. También es posible simular matrices séricas diluyendo mezclas acuosas de reserva del compuesto analizado con albúmina sérica humana, suero al cual se le hayan inactivado las enzimas, o Plasmonate (Miles, Inc. Elkhart, Indiana). También se puede usar una muestra de un paciente de la cual se sabe que contiene una concentración superior a la linealidad del método, y construir después una serie de diluciones usando materiales libres de compuesto analizado. La exactitud de las diluciones volumétricas es muy importante, y por lo tanto, no se recomienda hacer diluciones seriales debido a que los errores se propagan a través de las muestras subsiguientes. Es preferible preparar cada muestra por dilución directa a partir de la muestra de valor elevado o de la mezcla.

Finalmente, se deben hacer gráficas para realizar una inspección visual de la linealidad. El resultado real de cada análisis se representa en función del porcentaje de la muestra de concentración elevada, presente en cada dilución (o contra las concentraciones conocidas). La porción lineal de la curva resultante representa la porción lineal del análisis. En el caso de métodos con respuestas curvilíneas, tales como los procedimientos de radioinmunoanálisis, se deben representar los resultados obtenidos a partir de los algoritmos de regresión lineal con el fin de mostrar la linealidad de los resultados finales.

Error aleatorio y error sistemático

Por lo general, los errores que afectan el rendimiento de los procedimientos analíticos se clasifican en aleatorios o sistemáticos. Los factores que contribuyen al error aleatorio, son los que afectan la reproducibilidad de la medición. Entre estos se incluyen (1) la inestabilidad del instrumento, (2) variaciones en la temperatura, (3) variaciones en los reactivos y calibradores (y la estabilidad de la curva de calibración), (4) variabilidad en las técnicas de manejo como el pipeteo, mezcla y control de los tiempos y (5) variabilidad en los operadores. Estos factores sobreponen sus efectos entre sí a diferentes tiempos. Algunos producen fluctuaciones muy rápidas y, en otros, ocurre en un período largo de tiempo. Por consiguiente, el error aleatorio (RE) tiene componentes diferentes de variación que están relacionados con la disposición actual del laboratorio. El componente de variación *dentro de una corrida* (σ_{wr}) es causado por etapas específicas en el proceso, tales como la precisión en el pipeteo y variaciones a corto plazo de la temperatura y la estabilidad del instrumento. La variación intradiaria *entre corridas* (σ_{br}) es causada por la inestabilidad de la curva de calibración o por diferencias en recalibración que ocurren a través del día, variaciones a más largo plazo en el instrumento, cambios pequeños en las condiciones del laboratorio durante el día y la fatiga del personal del laboratorio. El componente *intradía* de variación (σ_{bd}) es causado por variaciones en el instrumento que ocurren a través de los días, cambios en los calibradores y reactivos (especialmente si se abren frascos nuevos cada día) y cambios en el personal de día a día. Aunque no es un componente aleatorio real de variación, cualquier variación en la curva de calibración a través del tiempo también afectará de manera considerable el componente intradiario de variación. Estos componentes se pueden combinar de tal manera que se puede obtener un cálculo de la varianza total del método (σ_t^2):

$$\sigma_t^2 = \sigma_{wr}^2 + \sigma_{br}^2 + \sigma_{bd}^2 \quad \text{Ec. 22-3}$$

Entre los términos usados para indicar el error aleatorio se incluyen *precisión*, *imprecisión*, *reproducibilidad* y *repetibilidad*. En cada uno de los casos se refieren a la dispersión aleatoria de los resultados de las mediciones alrededor de algún punto de tendencia central.

El error sistemático (ES) describe el error que es consistentemente alto o bajo. Si el error es consistentemente bajo o alto en la misma cantidad, independientemente de la concentración se designa como error sistemático *constante* (Fig. 22-2). Si el error es consistentemente bajo o alto en una cantidad proporcional a la concentración del compuesto analizado, se conoce como error sistemático *proporcional*.

Los factores que contribuyen al error sistemático constante son independientes de la



concentración del compuesto analizado, y la magnitud del error es constante a través de todo el intervalo de la concentración del compuesto analizado. El error sistemático constante es causado por una sustancia interferente presente en las muestras o los reactivos, provocando una señal falsa. El error puede ser positivo o negativo. Una reacción entre una sustancia interferente y los reactivos causada por una falta de especificidad es un ejemplo de error sistemático constante.

Una otra causa de un error sistemático es una sustancia interferente que interfiere en la reacción entre el compuesto analizado y los reactivos. Se observa este tipo de error en los métodos enzimáticos que usan reacciones acopladas oxidasa-peroxidasa en las cuales el peróxido de hidrógeno formado es destruido por agentes reductores endógenos, tales como el ácido ascórbico. Las sustancias interferentes también pueden inhibir o destruir el reactivo de modo que queda en cantidades subóptimas para reaccionar con el compuesto analizado. Una fuente no química de error sistemático constante es el error causado por el uso de blancos inapropiados de la muestra o los reactivos.

La causa más frecuente de error proporcional es la asignación incorrecta de la cantidad de sustancia en el calibrador. Si el calibrador tiene más compuesto analizado que la indicada en el rótulo, todas las determinaciones desconocidas darán bajas; una menor cantidad del compuesto que el rotulado provocará un error positivo. El error será proporcional al error de calibración original. El error proporcional también puede ser causado por una reacción secundaria del compuesto analizado. El porcentaje de la sustancia a determinar que participa en la reacción secundaria, será el porcentaje de error en el método.

Experimentos para Calcular la Magnitud de Errores Específicos

Al diseñar los experimentos que se usarán para determinar el error analítico de un método es imperativo que los experimentos se diseñen con cuidado para evitar conclusiones ambiguas. El propósito de esta sección es describir los experimentos específicos que permitirán calcular la magnitud de un error específico. Se puede comparar entonces el tamaño del error con el error permisible para determinar la aceptabilidad del método. Este enfoque se usa para todos los tipos de errores descritos anteriormente. Cada tipo de error se considera individualmente antes de que se puedan considerar las combinaciones de error. La Fig. 22-3 presenta una organización de los experimentos que se deben realizar para la determinación de errores específicos, organizados de tal manera que los experimentos fáciles se pueden hacer al comienzo. Los estudios finales más extensos (y costosos) se realizan únicamente si los errores calculados en estos experimentos preliminares son aceptables.

Error aleatorio calculado a partir de estudios de replicación

El experimento de replicación intracorrida es la forma más simple de estudio y debe ser la primera que se realiza para determinar evaluar el rendimiento de un método nuevo. Puesto que permite la evaluación de la precisión a través de un período de tiempo muy corto, los resultados no se pueden extrapolar para indicar el rendimiento a largo plazo. El rendimiento a corto plazo debe ser juzgado como aceptable antes de proseguir con el rendimiento a largo plazo del método.

El estudio de replicación se debe efectuar primero con una solución acuosa de calibrador o estándar y después repetirse con muestras cuya matriz es tan similar como sea



posible a la de las muestras de los pacientes. La concentración a estudiar debe ser, o estar cercana a las concentraciones de decisión médica para el compuesto analizado. Esta es la concentración a la cual los datos de laboratorio deben ser interpretados más críticamente; por esto se debe estar seguro del rendimiento del método a estas concentraciones.

Se desarrolla un cálculo del error aleatorio considerando análisis repetidos de la misma muestra. El 68% de los resultados están dentro de $\pm 1,0$ desviación estándar del promedio de la prueba y el 95% de los resultados están dentro del 1.96 DE de la media (ver pág. 348). Definimos el error aleatorio como cuatro veces la desviación estándar basados en recomendaciones que tendrán una probabilidad alta de pasar las pruebas de aptitud. [refs\(440\)](#) Si el cálculo del error aleatorio es menor que el error aceptable, el error aleatorio es aceptable. Un ejemplo del cálculo del error aleatorio se observa en la pág. 420.

Error constante calculado a partir de estudios de interferencia

El estudio de interferencia mide el error constante causado por la presencia de una sustancia sospechosa de interferir con el método en estudio. Para realizar este estudio se toma una muestra a la cual se le ha agregado el interferente. El volumen de esta adición debe ser pequeño, menos del 10% del volumen de muestra para que el efecto sobre la matriz de la muestra sea mínimo. Con el fin de compensar la dilución de la muestra se debe preparar una muestra de línea de base mediante la adición de una cantidad igual del solvente usado para el interferente, en otra alícuota de la muestra. A continuación se deben analizar las dos muestras, por lo menos por duplicado. La diferencia entre los resultados en las dos muestras se puede atribuir a la interferencia causada por la sustancia añadida.

Un esquema para estudiar los efectos de la hemólisis consiste en tomar dos muestras de sangre. Una es centrifugada y analizada directamente (muestra de base) y los glóbulos rojos del otro tubo son traumatizados físicamente para romper las membranas celulares con el fin de obtener una cantidad elevada de hemoglobina sérica. La muestra hemolisada es analizada después de centrifugarla. La diferencia entre las dos muestras se atribuye a los efectos de la hemólisis. Se puede simular una hemólisis ligera, moderada o severa dependiendo del volumen de glóbulos rojos traumatizados. Este enfoque tiene más coherencia con los problemas encontrados en el laboratorio, que el enfoque en el cual se añade hemoglobina pura a la muestra. Sin embargo, el procedimiento no es válido si los glóbulos rojos contienen el compuesto analizado.

Se pueden estudiar los efectos de la lipemia dividiendo una muestra lipémica en dos porciones; una se analiza directamente y la otra se somete a ultracentrifugación antes de su análisis para eliminar las lipoproteínas. La diferencia en los resultados es atribuible a los efectos de la lipemia. Alternativamente se pueden preparar también muestra turbias para cada concentración de nivel de decisión añadiendo cantidades pequeñas de IntraLipid (Cutter Laboratories, Inc., Berkeley, California) a muestras no lipémicas de concentraciones de compuesto analizado apropiadas a fin de obtener una lipemia ligera, moderada o groseramente visible. Las concentraciones de línea de base se preparan por adición de volúmenes iguales a agua a las muestras originales.

Soluciones con cantidades mayores de bilirrubina no conjugada pueden ser preparadas a partir de una solución de reserva preparada disolviendo bilirrubina pura en dimetilsulfóxido para obtener una concentración de 2.500 mg/L. Estas soluciones se añaden a sueros claros de pacientes no ictericos, hasta obtener la concentración deseada de bilirrubina. Las muestras de



línea de base se preparan como ya se ha indicado.

La elección de sustancias a probar es casi infinita. Para todos los métodos espectrofotométricos se deben determinar los efectos de hemólisis, ictericia y lipemia. También se deben ensayar otras sustancias que hayan sido reportadas como interferentes para métodos similares. (ver guía NCCLS EP-7^{ref(441)}). El pipeteo debe ser (1) preciso, para que las muestras de línea de base y las que contienen el interferente reflejen el mismo grado de dilución y (2) exactas con el fin de añadir una cantidad conocida de sustancia interferente. Nuevamente, es importante que la concentración del compuesto analizado en la muestra esté cercana a los niveles de decisión médica. Se debe añadir la sustancia considerada como posible interferente de tal manera que su concentración final sea la máxima fisiológicamente esperada. Si no se producen errores a esta concentración tan elevada se puede asumir que concentraciones menores no afectarán de manera adversa el rendimiento del método. Si el error es demasiado grande a la concentración máxima de sustancia interferente, es apropiado comprobar las interferencias a concentraciones menores. Una muestra ligeramente ictérica puede ser aconsejable, pero una groseramente ictérica, no. Se recomienda que estos estudios de interferencia sean realizados también con un método comparativo (ver más adelante) al mismo tiempo, con el fin de verificar la técnica experimental.

En la página 420 se muestra un ejemplo del cálculo del error constante a partir de datos obtenidos de un experimento de interferencia. La diferencia promedio total (sesgo) se conoce como *error constante (EC)*. Puesto que es independiente de la concentración del compuesto analizado. Este error constante se compara directamente con el error permisible al nivel de decisión apropiado. Si el error constante es menor que el error permisible, se juzga como aceptable el error causado por la interferencia. Esta decisión se basa en límites clínicos y no en una prueba estadística de significado (ver pág. 406 y 407). La desviación estándar de los valores de la interferencia es una medida de la incertidumbre del error constante calculado.

Error proporcional calculado a partir de un experimento de recuperación

Otro estudio preliminar es el experimento de recuperación. Este procedimiento implica la adición de una cantidad conocida del compuesto analizado a una alícuota de la muestra. Al igual que en el experimento de interferencia la muestra se divide en dos alícuotas. A una alícuota se le añade una solución con el compuesto analizado. Se añade un volumen igual de diluyente a la segunda; ésta se denomina muestra de línea de base. Posteriormente se analizan las dos muestras. La muestra de línea de base suministra la cantidad original del compuesto analizado. La diferencia entre los resultados de los análisis de la muestra con el compuesto analizado añadido y la muestra de línea de base indica la cantidad de compuesto analizado que se ha podido “recuperar”. Se calcula la cantidad del compuesto a medir añadido a la muestra a partir de la concentración de la solución “de reserva”, y del volumen añadido. El volumen de compuesto añadido a la muestra debe ser menor que el 10% para evitar una disgregación mayor de la matriz de la muestra. La exactitud del pipeteo es crítica debido a que se calcula la cantidad del compuesto añadido a partir del volumen. La concentración de la muestra y la cantidad añadida deben ser tales que permitan evaluar el rendimiento de la prueba cerca de los niveles de decisión médica del compuesto analizado. En ocasiones se añade una cantidad muy pequeña del compuesto a la muestra, y la cantidad recuperada se pierde en la aleatoriedad del método. Por esto es aconsejable efectuar dos a cuatro medidas en cada muestra con el fin de reducir los efectos de la imprecisión del método. Se recomienda el análisis de las muestras



con el método comparativo, como verificación de la técnica experimental.

La manera de calcular la recuperación se ilustra con un ejemplo en la pág. 421. Se define la *recuperación* como la relación entre la cantidad de compuesto analizado recuperada y la cantidad añadida, y se da como un porcentaje. La diferencia entre el porcentaje calculado de recuperación y 100% de recuperación es el porcentaje de error proporcional. La desviación estándar del porcentaje de recuperación es una medida de la incertidumbre del porcentaje de error proporcional. No se puede comparar el porcentaje de error proporcional directamente con el error permisible con el fin de definir la aceptabilidad, ya que el porcentaje de error proporcional no está expresado en unidades de concentración. Se puede hacer la conversión del error proporcional en unidades de concentración al nivel de decisión médica, tal como se muestra en las pags. 406 y 407. Si el error proporcional es menor que el error aceptable, el error proporcional es aceptable. Nuevamente, la decisión está basada en los requisitos médicos, más que en las pruebas estadísticas de significado.

Si el error aleatorio dentro de una corrida, el error constante y el error proporcional son aceptables, se llevan a cabo los experimentos de replicación interdiarios y los experimentos de comparación de métodos.

Experimentos de Evaluación Final

Los experimentos de evaluación final son los que requieren la mayor cantidad de tiempo y proveen potencialmente la mayor información acerca de rendimiento diario del método en estudio en las muestras reales de pacientes.

Experimento de replicación en varios días

El experimento de replicación en varios días es una expansión del experimento dentro de una corrida y se lleva a cabo durante un período de varios días, generalmente 20. Este período debe ser suficientemente largo como para permitir que los efectos aleatorios que se producen durante varios días influyan en la estimación del error aleatorio a largo plazo. Usualmente se combinan este experimento y el experimento de comparación de métodos, descrito más abajo, para obtener una mayor eficiencia en el estudio.

Se utiliza un material que permanezca estable durante el tiempo que dura el experimento. Generalmente se emplea una mezcla congelada de sueros o plasmas o un producto control liofilizado. La variación en el material de una alícuota a otra debe ser mínima, puesto que aparecerá como varianza intradiaria del método en estudio.

El error aleatorio se calcula como cuatro veces la desviación estándar total y se compara con el error permisible, tal como se describió previamente en el estudio dentro de una corrida.

Experimento de comparación de métodos.

El experimento de comparación de métodos determina el error sistemático del método en estudio usando muestras reales de pacientes. Se analiza un grupo de muestras de pacientes tanto por el método de prueba como por un método comparativo conocido como exacto y preciso. Las diferencias sistemáticas entre los dos métodos son interpretadas como errores del método de prueba, si se sabe que los resultados del método de comparación tienen poco error o ningún error (errores aleatorios y sistemáticos insignificantes). Por tanto, el método



comparativo debe ser de la más alta calidad posible, para que los errores no sean asignados al método en estudio. Los métodos se pueden clasificar de acuerdo a la calidad de su rendimiento como definitivos, de referencia o de rutina. Los métodos definitivos y de referencia se describen en el Capítulo 20.

En la práctica el método comparativo es con frecuencia el método de rutina en el laboratorio y no un método de calidad de referencia. Es útil observar como los resultados del método de prueba se comparan con los resultados del método de rutina, pero las diferencias entre los dos métodos se deben interpretar con cuidado a menos que se conozca que la calidad del método comparativo es alta.

Se deben analizar por lo menos 40 y preferiblemente 100 o más muestras de pacientes. Se deben incluir toda la gama de estados patológicos que la prueba encontrará en el uso rutinario. Las concentraciones analíticas de las muestras se deben distribuir uniformemente a través de todo el intervalo analítico; de otra forma el análisis de regresión de los datos comparativos serán inexactos. Sin embargo, las distribuciones uniformes no siempre son prácticas. La guía de la NCCLS para la comparación de métodos^{ref(442)} ha sugerido distribuciones alternativas. Se deben incluir muestras hemolisadas, lipémicas e ictericas a menos que el fabricante del método indique lo contrario, y si no causan error en el método comparativo. Si se incluyen en el estudio, deben ser identificadas. Las muestras deben ser seleccionadas cuidadosamente a fin de que representen de forma eficiente la carga de trabajo de rutina; por lo general suele ser necesario un preanálisis mediante el método de rutina.

Las muestras son analizadas en duplicado por cada uno de los métodos. Los resultados se deben examinar con cuidado y gratificadas diariamente. Cualquier muestra cuyos duplicados no concuerden de manera cercana por cualquiera de los métodos (o sea, que presenten una diferencia de más de 5,5 DS₄) debe ser reanalizada por los dos métodos en la corrida siguiente. Cualquier muestra con diferencias grandes entre los resultados de los dos métodos (esto significa con diferencias superiores al error permisible) también deben ser reanalizadas inmediatamente. Si se confirma la gran diferencia, el paciente debe ser investigado con el fin de determinar si presenta alguna enfermedad, y la muestra debe ser analizada para determinar otros compuestos (interferentes posibles) con el fin de determinar la gran diferencia. Es esencial un seguimiento inmediato para evitar preguntas incontestables sobre puntos extremos posteriormente.

Se deben correr los métodos de estudio y comparativos al mismo tiempo y tan cerca en tiempo como sea posible. Si esto no es posible las muestras deben ser almacenadas de tal manera que se garantice la estabilidad del compuesto analizado.

Generalmente se combina el experimento de comparación de métodos con el experimento de replicación de varios días. Las muestras de los pacientes se deben distribuir uniformemente en por lo menos cinco corridas, y preferiblemente 20, con el fin de garantizar que los efectos del día a día tengan la posibilidad de influir en los datos y garantizar que los efectos del día a día queden “totalmente despistados” (según la jerga estadística). Los dos métodos deben mantenerse bajo control de calidad aceptable durante el período.

Estadísticas de la prueba t : sesgo, S_a .

Se pueden calcular fácilmente las diferencias sistemáticas entre los métodos de prueba y comparativo a partir de los datos de la comparación de métodos mediante el sesgo. El sesgo es la diferencia entre el resultado promedio del método de prueba y el resultado promedio del



método comparativo. El sesgo puede indicar la magnitud del error sistemático entre los dos métodos. (Cada muestra de paciente debe haber sido analizada por los dos métodos para que el sesgo tenga validez). La fórmula del sesgo se observa en la ecuación 22-4 en la cual y_i y x_i son las concentraciones analíticas de las muestras individuales por los métodos de prueba y comparativo respectivamente y N es el número de resultados apareados que se comparan.

$$\text{Sesgo} = \frac{E(y_i - x_i)}{N} \quad \text{Ec. 22-4}$$

La desviación estándar del sesgo, conocida como la *desviación estándar de las diferencias*, s_d , se calcula de una manera análoga a la desviación estándar del experimento de replicación. Se puede considerar s_d como un indicador del error aleatorio entre los dos métodos.

$$s_d = \sqrt{\frac{\sum (y_i - x_i - \text{Sesgo})^2}{N}} \quad \text{Ec. 22-5}$$

El significado estadístico del sesgo, o sea, si realmente difiere de cero, o sea que no hay sesgo, se determina usando la prueba t . El valor t se calcula de acuerdo a la fórmula

$$t = \frac{\text{Sesgo} \cdot \sqrt{N}}{s_d} \quad \text{Ec. 22-6}$$

Esta es la misma estadística t descrita en la ecuación 19-13. El valor t es la relación entre un término de error sistemático (sesgo) y un término de error aleatorio (s_d). Si el sesgo aumenta con respecto a la desviación estándar de las diferencias, hay menos probabilidad de que el sesgo observado sea causado por la variación aleatoria, y más probabilidad de que exista una diferencia sistemática entre los valores promedio de los métodos de prueba y comparativo. Por ejemplo en un estudio de comparación de métodos de glucosa hubo 101 muestras, el sesgo fue de 30 mg/L, y el valor t fue 2.11. El valor crítico t para $p = 0.05$ y para 100 grados de libertad (el cual se puede obtener de un libro de texto en estadística) es 1.99. (Se usa el valor t crítico bilateral porque la desviación puede ser positiva o negativa). El valor t calculado supera el valor t crítico; por consiguiente existe un sesgo estadístico real entre los dos métodos (ver también p. 353).

La aceptabilidad del error sistemático calculado mediante el sesgo se juzga por comparación con el error permisible. Si el sesgo es menor que el error permisible el error sistemático es aceptable. Si el sesgo supera el error permisible, el error sistemático no es aceptable. Las decisiones con respecto a la aceptabilidad no pueden estar basadas en el valor t únicamente. Se puede dar el caso de que se combinen un sesgo grande con una s_d pequeña para dar un valor t insignificante, a pesar de que el sesgo sea inaceptablemente grande. También se puede observar de la ecuación que si N es muy grande el valor de t se puede volver estadísticamente significativo para algunas relaciones del sesgo a s_d , indicando un sesgo estadísticamente significativo aunque el sesgo puede no tener importancia médica.

Westgard y Hunt^{ref(443)} han demostrado que el sesgo puede dar estimaciones inexactas



del error sistemático en presencia de un error proporcional, puesto que en el sesgo se combinan tanto los errores proporcionales como los constantes. El error proporcional también aumenta el s_d . No se debe usar el sesgo para calcular el error sistemático a menos que el error proporcional esté ausente, o que la medida de la concentración del compuesto analizado esté muy cerca de la concentración del nivel de decisión (X_C) y que los datos se distribuyan de manera adecuada alrededor de X_C . De otro modo la desviación será ponderada hacia el lado de X_C que tiene la mayoría de las muestras con sesgos individuales grandes.

Coefficiente de correlación.

La estadística citada con mayor frecuencia en los experimentos de comparación de métodos es el coeficiente de correlación (r). Un valor r de cero indica que no hay correlación entre los métodos. Un valor de +1 indica una correlación positiva perfecta. En el Capítulo 19 se encuentra una discusión más extensa sobre el cálculo de las estadísticas de regresión lineal y su interpretación.

Con frecuencia se usa el coeficiente de correlación de manera equivocada en los informes de evaluación de métodos. Westgard y Hunt^{ref(444)} demostraron que el coeficiente de correlación es sumamente sensible al intervalo de concentraciones del compuesto analizado de las muestras de los pacientes en el experimento de comparación de métodos. Cuando se hizo un estudio de comparación de métodos de bilirrubina en un intervalo de 0-45 mg/L, se obtuvo un coeficiente de correlación de 0.950. Cuando se eliminaron los pares de datos con concentraciones de bilirrubina superiores a 15 mg/L el coeficiente de correlación cayó a 0.773. Esto se observa en la Fig. 22-4.

El coeficiente de correlación es simplemente una manera de buscar una correlación más no una concordancia entre los pares. Por lo tanto, si los valores de una población son el doble de la otra, al doblar el valor de una población, el valor de la otra población también se doblaría. La correlación entre los dos métodos sería excelente (valor alto de r). Por lo tanto, las decisiones acerca de la aceptabilidad del desempeño analítico de un método no se pueden basar únicamente en el coeficiente de correlación.

Estadísticas de regresión lineal.

Si el método en estudio y el método comparativo correlacionan bien entre sí, un gráfico de los resultados x : y se asemeja a una línea recta la cual puede ser descrita mediante la expresión de regresión lineal.

$$Y_i = a + bx_i \quad \text{Ec. 22-7}$$

donde Y_i es el valor calculado en la recta que corresponde al resultado actual del método comparativo x_i . La proporcionalidad entre los dos métodos está dada por la pendiente, b , cuyo valor ideal (sin error proporcional) es 1. El error constante está indicado por el intercepto, a . El error aleatorio entre los métodos está indicado por el error estándar de la regresión también llamado el error estándar de la estimación, o la “desviación estándar de los residuales.”

Se puede obtener un error estándar del error sistemático en X_C , la concentración del nivel de decisión a partir de las estadísticas de regresión lineal sustituyendo X_C por x_i en la

ecuación 22-7, con el fin de calcular Y_C , la concentración que el método de prueba daría para una muestra cuya concentración analítica se designa como X_C . El error sistemático, ES, se calcula restando X_C de Y_C .

$$ES = |Y_C - X_C| = |a + bX_C - X_C| \quad \text{Ec. 22-8}$$

El cálculo del error sólo será válido si se observan las siguientes limitaciones de la regresión lineal.

Los datos usados para calcular la ecuación de regresión (ecuación 22-7) deben ser graficados y examinados cuidadosamente para detectar no linealidad y se deben limitar los datos usados para el cálculo final a los datos en el intervalo lineal. La falta de linealidad a concentraciones más altas disminuirá la pendiente, aumentará el intercepto y aumentará $s_{y,x}$.

Se deben examinar cuidadosamente los datos para buscar puntos muy alejados del resto. No se puede hacer suficiente énfasis en la necesidad de examinar y graficar diariamente los datos de la comparación de los métodos. Se deben detectar inmediatamente muestras con resultados desviados del resto (por ejemplo para las cuales $|y_i - Y_i| > 3,5 s_{y,x}$) y reanalizadas por los dos métodos de tal manera que los datos puedan corregir o confirmar los datos. La línea de regresión lineal es “arrastrada” hacia el dato desviado y los mayores efectos son causados por los datos desviados situados en los extremos de los datos. En el caso de confirmarse los resultados desviados del resto, se deben investigar las causas de su presencia. La confirmación de uno de estos datos es representativa del rendimiento analítico real del método. Se debe calcular el error sistemático del método de prueba incluyendo y excluyendo el punto desviado de la serie de datos. Si los errores son aceptables excluyendo el punto desviado, y excesivos cuando se incluye se debe ejercer una precaución extrema. Hay pruebas estadísticas para eliminar estos puntos^{ref(445)} (ver págs. 363), pero no se debe excluir más de un punto en un conjunto de 40 comparaciones de pacientes. En el caso de que la discrepancia sea menor que el error permisible, no se debe excluir aunque pueda ser un punto discrepante estadísticamente significativo. Si existe más de un punto desviado significativo por cada 40 muestras de comparación de pacientes, se debe rechazar el método de prueba hasta que se pueda encontrar y corregir la causa para estos puntos.

El intervalo de concentraciones analíticas debe ser amplio. Los efectos de un intervalo estrecho de datos sobre las estadísticas de mínimos cuadrados pueden ser vistos en la Fig. 22-5. Con frecuencia los datos de la comparación de métodos no satisfacen la presunción adicional de los cálculos de regresión lineal. Esta presunción requiere que los datos x (de comparación) se conozcan sin error. En realidad en un experimento de comparación de métodos los errores aleatorios afectan los resultados del método de comparación. Cuando el intervalo de datos es suficientemente grande, el efecto provocado por la falla de conocer los datos x sin error se vuelve despreciable.^{refs(446)}

Waakers y asociados^{ref(447)} han sugerido que se use el coeficiente de correlación para decidir si el intervalo de datos es suficiente para usar los cálculos tradicionales de los mínimos cuadrados. Si el coeficiente de correlación es superior a 0,99 se puede calcular de este modo una pendiente cuyo error matemático será menor del 1%. Si el coeficiente de correlación será menor de 0,99, la pendiente será falsamente baja y el intercepto y será muy alto. Combleet y Gochman^{ref(448)} han sugerido otro límite de decisión. Si la relación entre la desviación estándar



del método comparativo, S_{CM} , a la desviación estándar de la población del método- x S_x es menor de 0.2 el cálculo de los mínimos cuadrados será adecuado. Si las pruebas de los datos fallan, se debe utilizar otro método de regresión, como los discutidos por Combleet y Gochman^{ref(449)} (ver también el Capítulo 19).

El cálculo del error sistemático usando las estadísticas de regresión lineal se demuestra en la p. 422.

Cálculo del Error Total

Los cálculos del error aleatorio y del error sistemático se combinan para calcular el error total del método de prueba. Este es el criterio más severo que el método de prueba debe cumplir. En la Fig. 22-6 se ilustran las pautas para el concepto del error total. La línea horizontal es el error en unidades de concentración y la línea vertical está colocada en la concentración del valor verdadero, la concentración del nivel de decisión médica o error cero. La distancia vertical de la línea horizontal representa la probabilidad de obtener un resultado en el método de prueba a cualquier cantidad de error (diferencia de X_C). La curva en forma de campana muestra la distribución de los datos del método de prueba obtenidos a partir de análisis repetidos de una muestra de paciente cuya concentración analítica verdadera ha sido designada como X_C . La distancia desde el promedio de la curva al valor verdadero es el error sistemático. La dispersión alrededor del promedio de los datos es el error aleatorio, el cual ha sido definido como cuatro veces la desviación estándar. Habrá (1) instancias en las cuales el error combinado será exactamente igual al error sistemático, (2) otras veces cuando el error combinado de un resultado dado será menor que el error sistemático promedio en una cantidad debido al error aleatorio del método y (3) otras veces en que el error combinado será mayor que el error sistemático, nuevamente por la misma cantidad debido al error aleatorio del método. El médico no tiene manera de saber cuales son los diversos componentes del error o cuando estos causarán un error mayor. Por lo tanto, es esencial considerar la combinación del peor caso y definirla como error total (ET):

$$ET = RE + ES$$

Ec. 22-9

Si el error total es menos que el error permisible, el rendimiento total del método es aceptable. En la p. 422 se demuestra el cálculos del error total.

En la Tabla 22-2 se resumen las ecuaciones para estimar las magnitudes de los diferentes errores y el criterio para juzgar su aceptabilidad.

Criterios para los Intervalos de Confianza a Fin de Juzgar el Desempeño Analítico

Hasta ahora se ha asumido que el error calculado por cada una de las ecuaciones anteriores es absolutamente exacto. Sin embargo, si se repitiera el mismo experimento en la forma más idéntica posible, probablemente se obtendría una estimación del error ligeramente diferente. A partir del número limitado de muestras analizadas en los procedimientos antes recomendados no se pueden obtener mediciones exactas de los errores aleatorios y sistemáticos.



En el método desarrollado por Westgard, Carey y Wold,^{ref(450)} se calculan los límites 95% superior e inferior de error. Si el límite superior 95% de un error es menor que el error permisible, se puede estar por lo menos un 95% seguro de que el rendimiento del método es aceptable. Si el límite inferior 95% es mayor que el error permisible, se puede estar por lo menos un 95% seguro de que el rendimiento del método no es aceptable y no se indican pruebas posteriores. El método debe ser rechazado o modificado a fin de mejorar su rendimiento analítico. Cuando el límite inferior 95% es menor que el error permisible, y el límite superior 95% de error excede el error permisible, no se puede decidir si el método es inaceptable o aceptable y se requieren más datos para una precisión definitiva.

En las págs..420-422 se ofrecen ejemplos de cálculos de estimación de intervalo de confianza para cada tipo de error. Comentarios adicionales sobre los límites de confianza se encuentran en las págs..348-350.

Criterios para el intervalo de confianza para el error aleatorio

En el cálculo del error aleatorio no se conoce el verdadero valor de la desviación estándar. Es posible calcular los límites de confianza superior e inferior de la desviación estándar, multiplicando la desviación estándar observada por los factores unilaterales adecuados del 95%. Estos factores (ver Tabla 22-3) están referidos a $N - 1$ grados de libertad.

$$s_{TM_s} = s_{TM} \cdot A_s \quad \text{Ec. 22- 10, a}$$

y

$$s_{TM_i} = s_{TM} \cdot A_i \quad \text{Ec. 22- 10, b}$$

donde A_s y A_i son los factores para calcular los límites unilaterales superior e inferior de la desviación estándar.^{ref(451)}

El límite superior de confianza del error aleatorio es cuatro veces el límite superior de confianza de la desviación estándar y el límite inferior de confianza del error aleatorio es cuatro veces el límite inferior de confianza de la desviación estándar.

$$RE_s = 4 \cdot s_{TM_s} \quad \text{Ec. 22-11, a}$$

y

$$RE_i = 4 \cdot s_{TM_i} \quad \text{Ec. 22-11, b}$$

Criterio del intervalo de confianza para error aleatorio

Los límites superior e inferior para el error constante de calculan a partir de datos de los estudios de interferencia. Nuevamente se obtiene un límite superior de modo que exista una probabilidad del 95% de que el verdadero error sea menor que ese límite.

$$EC_s = EC + \frac{t \cdot s}{\sqrt{N}} \quad \text{Ec. 22-12, a}$$

y

$$EC_i = EC - \frac{t \cdot s}{\sqrt{N}} \quad \text{Ec. 22-12, b}$$



El valor t es un t unilateral del 95%. La Figura 22-7, A, ilustra el límite superior del 95% de error constante dejando sólo una probabilidad del 5% de que el error exceda este límite superior, EC_s . En forma similar, la Figura 22-7, B, ilustra el límite inferior del 95% del error constante, EC_i . Se utiliza una t unilateral sólo cuando existe preocupación sobre el límite superior del error constante, independientemente de lo pequeño que sea dicho error y viceversa para un límite inferior. (Se utiliza una t bilateral para contestar la pregunta ¿existe una diferencia? sin considerar si la diferencia es positiva o negativa como en la prueba t empleada en la interpretación del experimento de comparación de métodos.)

Criterio de intervalo de confianza para el error proporcional

Se usa un enfoque similar para estimar los límites superior e inferior en experimentos de recuperación. En la siguiente ecuación se emplea un valor unilateral de t para $N - 1$ grados de libertad y un límite del 95%.

$$\bar{R}_s = \bar{R} + \frac{t \cdot s}{\sqrt{N}} \quad \text{Ec. 22-13, a}$$

y

$$\bar{R}_i = \bar{R} - \frac{t \cdot s}{\sqrt{N}} \quad \text{Ec. 22-13, b}$$

donde R es la media de la recuperación y s es la desviación estándar de la recuperación (ver p. 412). El límite superior de confianza del porcentaje de error proporcional es el límite de confianza, que está a mayor distancia del valor ideal de 100%, y el límite inferior de confianza del porcentaje de error proporcional es el límite de confianza más cercano al 100%. Estos porcentajes son convertidos en unidades de concentración a la concentración o concentraciones críticas para efectuar la comparación con el error permisible.

$$EP_s = X_C \left| \frac{\bar{R}_s \text{ or } (\bar{R}_i - 100)}{100} \right|_s \quad \text{Ec. 22-14, a}$$

$$EP_i = X_C \left| \frac{\bar{R}_i \text{ or } (\bar{R}_s - 100)}{100} \right|_i \quad \text{Ec. 22-14, b}$$

Criterio del intervalo de confianza para el error sistemático

La Figura 22-8 ilustra el perfil de un intervalo de confianza alrededor de la línea de regresión de mínimos cuadrados. La expresión para los límites, w , de este intervalo, está dada por la siguiente ecuación:



$$w = t \cdot s_{y,x} \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{(X_C - \bar{X})^2}{\sum (x_i - \bar{X})^2}}$$

Ec. 22-15

Esta ecuación es similar a la usada para calcular los límites para error constante y proporcional en términos de los componentes $t \cdot s_{y/x}$. El componente bajo el signo de raíz cuadrada se convierte en $1/N$ si X_C es igual al promedio de los datos de los pacientes por el método comparativo. En la medida en que X_C se aleje de la media, este término comienza a contribuir a la expansión de los límites. El denominador del segundo término puede ser calculado a partir de la desviación estándar de la población de los pacientes por el método comparativo (s_x) de la siguiente manera:

$$\sum (x_i - \bar{X})^2 = s_x^2 (N - 1)$$

Ec. 22-16

En este caso no se puede saber exactamente cual es la línea de regresión, y para un X_C el Y_C correspondiente puede ser tan grande como $(Y_C + w)$, o tan pequeño como $(Y_C - w)$. El límite que está más lejos del valor ideal se usa para calcular el límite superior del error sistemático, y el límite más cercano al valor ideal se usa para calcular el límite inferior del error sistemático.

$$ESs = |(Y_C \pm w) - X_C|_u$$

Ec. 22-17, a

y

$$ESi = |(Y_C \pm w) - X_C|_l$$

Ec. 22-17, b

Es posible que la ecuación 22-15 no suministre un estimado válido para los límites de confianza de la línea de regresión lineal si la precisión del método en estudio no es razonablemente constante a través de todo el intervalo de las muestras de los pacientes incluidas en el experimento de comparación de métodos.

Criterio de intervalo de confianza para el error total

Como ya se describió, el error total es la combinación (peor caso) de los errores aleatorios y sistemáticos. Dado que ambos tipos de errores tienen varianzas incluidas en las ecuaciones utilizadas, para calcularlos deben ser combinados vectorialmente. Sus varianzas se combinan de la siguiente manera:

$$ET_s = \sqrt{ER_s^2 + w^2} + SE$$

Ec. 22- 18, a

y

$$ET_i = \sqrt{ER_i^2 + w^2} + SE$$

Ec. 22- 18, b

Si el límite superior 95% del error total es inferior al error permitido, se puede estar seguro en



un 95% de que el método rinde aceptablemente. Si el límite inferior 95% del error total es mayor que el error permitido se puede estar seguro en un 95% de que el método no rinde aceptablemente y debe ser modificado o rechazado.

Se debe destacar que toda vez que el valor ideal (condición de error cero) está entre los límites superior e inferior del error estimado hay una posibilidad de que el error verdadero sea igual a cero. Por lo tanto, en estas situaciones, el límite inferior del error es simplemente cero. El límite superior del error sigue siendo el ya calculado. Esta situación se puede presentar para los cálculos de los errores constantes, proporcional o sistemáticos, pero obviamente no para los errores aleatorios. Si el límite inferior del error sistemático es cero, el límite inferior del cálculo del error total es igual al límite inferior del cálculo del error aleatorio puesto que es posible que no haya error sistemático.

En la Tabla 22-4, se resumen las ecuaciones para calcular los intervalos de confianza de los diferentes errores y los criterios para juzgar su aceptabilidad.

Otros Protocolos de Evaluación y Estrategias para Abordar el Análisis de Datos

El NCCLS, ha propuesto una serie de protocolos de evaluación. El primero, EP5-P se usa para la evaluación de la precisión y la verificación de los datos de precisión suministrados por el fabricante.^{ref(452)} Requiere mediciones por duplicado de mezclas de muestras que contengan por lo menos dos niveles diferentes del compuesto analizado, por corrida, dos veces diarias, durante 20 días. Se usa un análisis del cálculo de la varianza para determinar los componentes de la varianza, en-una-corrida, en-un-día, y día-a-día. Estas se combinan después para calcular la desviación estándar total.

La guía EP6-P, se refiere tanto a los procedimientos experimentales como a los análisis de datos para evaluar la linealidad del análisis.^{ref(453)} Se presentan procesos estadísticos para determinar el límite de linealidad y para calcular los errores causados por la no linealidad a una concentración particular.

Otra guía de la NCCLS, la EP7-P presenta dos enfoques para las pruebas de interferencia en el laboratorio de química clínica.^{ref(454)} El primer enfoque es similar al ya discutido en las págs. 411-412. El segundo enfoque describe la determinación de interferencias a concentraciones cada vez mayores del interferente (método de dosis-respuesta). La lista presenta también listas extensas de interferentes exógenos y endógenos, y concentraciones recomendadas para los análisis.

La guía de la NCCLS EP9-P^{ref(455)} se refiere a aspectos críticos en los estudios de comparación de métodos. El protocolo requiere que se obtengan resultados por duplicado para cada procedimiento con el fin de facilitar las pruebas que buscan detectar los valores fuera de límites. Se deben analizar un mínimo de 40 muestras a través de todo el intervalo reportable. Se describen varias formas para calcular el sesgo entre los dos métodos y su intervalo de confianza, para ser usados dependiendo de la naturaleza de los datos, tal como fueron determinados en la revisión preliminar.

Se han propuesto diseños experimentales multifactoriales, para observar varias características simultáneamente.^{ref(456)} Un ejemplo especial de este enfoque es la guía de la



NCCLS, EP-10, titulada *Evaluación de los métodos cuantitativos del Laboratorio Clínico*.^{ref(457)} Este protocolo permite el cálculo de la imprecisión, la inexactitud, la no linealidad, el arrastre y la tendencia en una serie de estudios realizados en un período de 5 días, usando tres niveles del compuesto analizado. Las muestras deben ser medidas en una secuencia específica para un total de tres lecturas diarias, así como dos muestras “primarias” de la muestra de concentración media, para un total de 11 análisis diarios, o 55 en el estudio completo. Se debe anotar que en el caso de observar efectos no usuales, cada efecto debe ser investigado a profundidad realizándole un estudio específico a cada factor por separado, de la manera como se ha descrito en este capítulo.

Otro enfoque estadístico que se ha usado para resumir la comparación entre dos métodos, es el enfoque multivariado en el cual tanto el valor de x como el valor de y varían con la imprecisión. El análisis tradicional lineal de la regresión por mínimos cuadrados se hace basado en la premisa que el valor de x se conoce sin error. El enfoque Deming^{refs(458)} determina la mejor pendiente como aquella que minimiza la suma de los cuadrados de los residuales determinados perpendicularmente de la línea (en oposición a sólo en la dirección y por el método tradicional de los mínimos cuadrados). El enfoque Deming es mucho más robusto y proporciona un buen cálculo de la pendiente, inclusive cuando los datos no son precisos o cuando los datos están limitados a un intervalo estrecho (ver también p.363). El método de Passing- Bablock^{ref(459)} implica el dibujo de líneas rectas entre cada par de datos y después ordenar las pendientes y seleccionar la pendiente mediana como el mejor estimado no paramétrico de la pendiente. Este enfoque no asume absolutamente nada en lo que respecta a la distribución de los datos. Una desventaja de este enfoque es que el número de cálculos aumenta dramáticamente con un número creciente de datos, colocando, por lo tanto, un límite práctico al tamaño del estudio que se puede analizar.

Discusión

Hay casos, como en el estudio de diferentes métodos enzimáticos, en los que no se espera o no es posible una coincidencia adecuadamente estrecha debido a las diferentes condiciones de reacción o las diferentes definiciones de las unidades enzimáticas. En estos casos, antes de concluir que el método es inaceptable, se requiere una nueva línea de base clínica de información y un nuevo intervalo de referencia (ver Capítulo 20). Se deben obtener datos relacionados con enfermedades específicas para proveer una nueva información clínica para la interpretación de los resultados del método en estudio.

La evaluación de un método para una “nueva” variable analítica, no medida previamente en el laboratorio, es una situación similar. Puesto que no se dispone de un método comparativo, será más difícil obtener estimados exactos del error sistemático. Aumenta la dependencia en los reportes de evaluación publicados. Se deben revisar cuidadosamente las conclusiones de estos reportes, una vez que se hayan completado los análisis de los datos experimentales propios. Si no se mide corrientemente el compuesto analizado, se debe desplazar a experimentos que estimen errores específicos. Es esencial que los estudios de recuperación sean exactos. Los estudios de interferencia se amplían para cubrir una gama mayor de sustancias químicas que puedan interferir con las reacciones de medición. Muestras de pacientes que hayan sido analizadas en otro laboratorio pueden ser

analizadas para compararlas, pero la confiabilidad del cálculo del error sistemático puede estar disminuida debido a la inestabilidad de la muestra y la falta de control del procedimiento del otro laboratorio. Sin embargo, si el otro laboratorio es el laboratorio de referencia al cual el usuario ha referido muestras con anterioridad para que le hagan análisis del compuesto analizado, la comparación se hace realmente con la práctica actual.

Con frecuencia, los laboratorios pequeños no tienen los recursos para estudios exhaustivos de evaluación de métodos, sin embargo, afortunadamente estos laboratorios tampoco están entre los primeros laboratorios que van a evaluar un método nuevo. Usualmente se han publicado algunos reportes de evaluación. Aun cuando el rendimiento de un método esté bien documentado, mediante estudios de evaluación publicados, el usuario debe, empero, evaluar el error aleatorio y realizar estudios de comparación de métodos para verificar el rendimiento aceptable en su propio laboratorio. Se debe efectuar un estudio de intervalo de referencia (ver Capítulo 20)

Usando los enfoques y herramientas para tomar decisiones que se han descrito en este capítulo es posible realizar la evaluación de métodos eficiente y objetivamente. El hecho de efectuar la evaluación de un método le permite al laboratorista entender las capacidades y cualidades de un ensayo, antes de usarlo rutinariamente en las pruebas de los pacientes independientemente de si la evaluación es requerida por disposiciones gubernamentales.

Ejemplos del Cálculo y Toma de Decisiones para un Estudio de Evaluación de Desempeño para la Glucosa

1. Cálculo del error aleatorio a partir de datos de replicación

a. Cálculos estadísticos. (y_i = Resultados del método que está siendo evaluado)

Promedio:

$$\bar{y} = \frac{\sum y_i}{N}$$

Desviación estándar:

$$s_{TM} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \bar{y})^2}{N - 1}}$$

6

$$s_{TM} = \sqrt{\frac{\sum y_i^2 - (\sum y_i)^2 / N}{N - 1}}$$

Coeficiente de variación:

$$CV = \frac{s_{TM}}{\bar{y}} \cdot 100\%$$



Ejemplo. Para glucosa

$$N = 20, \sum y_i = 23,840 \text{ y } \sum y_i^2 = 284,180,470$$

$$\bar{y} = 1.192 \text{ mg/L}$$

$$s_{TM} = 20.1 \text{ mg/L}$$

$$CV = 1.7\%$$

b. Estimado puntual del error aleatorio (RE)

$$RE = 4 \cdot s_{TM}$$

Si $RE < EA$, el rendimiento es aceptable.

Ejemplo. Para la glucosa, $R_E = 120 \text{ mg/L}$ a $Y_C = 1.200 \text{ mg/L}$

$$\bar{y} = 1.192 \text{ mg/L}$$

$$s_{TM} = 20.1 \text{ mg/L}$$

$$RE = 4 \cdot 20.1 = 80.4 \text{ mg/L}; RE \text{ es aceptable.}$$

c. Estimado del intervalo de confianza del error aleatorio (RE_s , RE_i)

$$s_{TM_u} = s_{TM} \times (A_{.95}) \dots (\text{ver Tabla 22-3})$$

$$= 20.1 \times 1.358 = 27.3 \text{ mg/L}$$

$$s_{TM_l} = s_{TM} \times (A_{.05})$$

$$= 20.1 \times 0.7979 = 16.0 \text{ mg/L}$$

$$RE_s = 4 \cdot s_{TM_u} = 4 \cdot 27.3 = 109 \text{ mg/L}$$

$$RE_i = 4 \cdot s_{TM_l} = 4 \cdot 16 = 64 \text{ mg/L}$$

Puesto que $RE_u < EA$, estamos seguros en un 95% que el error aleatorio es aceptable.

2. Cálculo del error constante a partir de un estudio de interferencias para un método de glucosa

a. Preparación de la muestra

(1) 1.00 mL de suero A + 0.10 mL de agua



- (2) 1,00 mL de suero A + 0.10 mL de estándar de creatinina de 1000 mg/L
(3) 1,00 mL de suero A + 0,10 mL de estándar de creatinina de 3000 mg/L

b. Resultados

Creatinina añadida (mg/L)	Glucosa medida (mg/L)	Interferencia (mg/L)	Interferencia promedio (EC) (mg/L)
(1) -----	1.200, 1.220, 1.190	-----	-----
(2) 91	1.240, 1.240, 1.230	+40, +20, +40	+33
(3) 273	1.310, 1.340, 1.290	+110, +120, +100	+110

c. Fórmulas para los cálculos

Concentración añadida =

$$\text{Concentración del estándar} \times \frac{\text{Volumen de estándar}}{\text{Volumen total}}$$

Interferencia = Concentración (prueba) – Concentración (basal)

d. Cálculo del error constante (EC)

$$\text{EC} = \text{Interferencia}$$

Si $\text{EC} < E_A$, el rendimiento es aceptable.

Ejemplo. Para la glucosa $E_A = 120$ mg/L a $X_C = 1.200$ mg/L

En la presencia de 91 mg/L de creatinina, $\text{EC} = 33$ mg/L; EC es aceptable.

En la presencia de 273 mg/L de creatinina, $\text{EC} = 110$ mg/L; el EC es apenas aceptable, pero no permite mucha imprecisión

e. Cálculo del intervalo de confianza del error constante (EC_s , EC_i)

(1) en la presencia de 91 mg/L de creatinina, $\text{EC} = 33$ mg/L, $s = 11,5$ mg/L, $N = 3$ y t para $(N-1)$ o dos grados de libertad en el límite unilateral 95% es 2.92 (ver p. 350).

$$\text{EC}_s = \text{EC} + \frac{t \cdot s}{\sqrt{N}}$$

$$\text{EC}_s = 33 + \frac{2.92 \cdot 11.5}{\sqrt{3}} = 52 \text{ mg/L}$$



$$EC_i = EC + \frac{t \cdot s}{\sqrt{N}}$$
$$EC_s = 33 + \frac{2.92 \cdot 11.5}{\sqrt{3}} = 14 \text{ mg/L}$$

Puesto que $EC_s < E_A < (52 < 120 \text{ mg/L})$ el error constante causado por 91 mg/L de creatinina es aceptablemente pequeño.

(2) En la presencia de 273 mg/L de creatinina, $EC = 110$, $s = 10 \text{ mg/L}$, $N = 3$.

$$EC_s = 110 + \frac{2.92 \cdot 10}{\sqrt{3}} = 127 \text{ mg/L}$$

$$EC_i = 110 - 2.92 \cdot 103 = 93 \text{ mg/L}$$

Puesto que $EC_i < E_A < EC_s$ no podemos estar 95% seguros de que el método sea aceptable o 95% seguros de que el método no sea aceptable para el análisis de la glucosa en presencia de 273 mg/L de creatinina. Se deben obtener más datos para estrechar los límites de confianza a uno u otro lado de E_A .

3. Cálculo del error proporcional a partir de un estudio de recuperación para un método de glucosa

a. Preparación de la muestra

- (1) 2.0 mL de suero A + 0.1 mL de agua
- (2) 2.0 mL de suero A + 0.1 mL de estándar de glucosa (10,000 mg/L)
- (3) 2.0 mL de suero B + 0.1 mL de agua
- (4) 2.0 mL de suero B + 0.1 mL de estándar de glucosa (10,000 mg/L)

b. Resultados (mg/L)

Muestra	Glucosa añadida	Glucosa medida	Glucosa recuperada (Prueba-Basal)	Porcentaje de recuperación*
(1) Basal	-----	510,530,540	-----	-----
(2) Añadida	476	970, 1.000, 980	460,470,440	96,6%, 98,7%, 92,4%
(3) Basal	-----	1.240, 1.200, 1.210	-----	-----
(4) Añadida	476	1.690, 1.660, 1.640	450,460,430	94,5%, 96,6%, 90,3%

*Recuperación promedia (R) = 94.8%; DE de la recuperación (s_R) = 3.09%; DE de la recuperación



promedio = 1.26%.

c. Fórmulas para los cálculos

$$\text{Concentración añadida} = \text{Concentración del estándar} \times \frac{\text{Volumen de estándar}}{\text{Volumen total}}$$

$$\text{Concentración recuperada} = \text{Concentración (prueba)} - \text{Concentración (basal)}$$

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\text{Concentración recuperada}}{\text{Concentración añadida}} \times 100$$

d. Cálculo del error proporcional (EP)

$$\text{EP}(\%) = \frac{|\bar{R} - 100|}{\bar{R}}$$

$$\text{EP (unidades de concentración)} = \frac{|\bar{R} - 100|}{100} \cdot X_C$$

Si $\text{EP} < E_A$, el rendimiento es aceptable.

Ejemplo: Para la glucosa $E_A = 120 \text{ mg/L}$ a $X_C = 1.200 \text{ mg/L}$

$$\bar{R} = 94.8\%$$

$$\text{EP}(\%) = |94.8 - 100| = 5.2\%$$

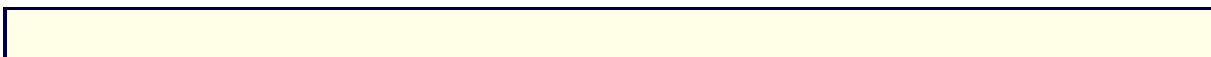
6

$$\text{EP} = \frac{|94.8 - 100|}{100} \cdot 1.200 \text{ mg/L} = 62 \text{ mg/L}$$

EP es aceptable.

e. Cálculo del intervalo de confianza para el error proporcional (EP_s , EP_i)

$\bar{R} = 94.8\%$, $s = 3.09\%$, $N = 6$, y t para $(N - 1)$ o 5 grados de libertad en el límite unilateral 95% es 2,02.



$$\bar{R}_s = \bar{R} + \frac{t \cdot s}{\sqrt{N}}$$

$$R_s = 94.8 + \frac{2.02 \cdot 3.09}{\sqrt{6}} = 97.4\%$$

$$\bar{R}_i = \bar{R} + \frac{t \cdot s}{\sqrt{N}}$$

$$R_i = 94.8 + \frac{2.02 \cdot 3.09}{\sqrt{6}} = 97.4\%$$

El límite que se desvía más de la recuperación ideal del 100% se usa para calcular el límite superior del error proporcional $EP_s\%$.

$$EP_s\% = |92.3 - 100| = 7.7\%$$

y para el límite inferior

$$EP_i\% = |92.3 - 100| = 2.7\%$$

Para relacionar $EP_s\%$ o $EP_i\%$ a E_A , conviértalos en unidades de concentración a X_C .

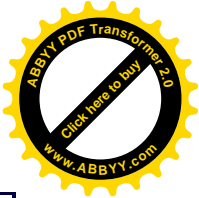
$$EP_s = \frac{EP_s\%}{100} \cdot X_C$$

$$= \frac{7.7\%}{100} \cdot 1200 = 92 \text{ mg/L}$$

$$EP_i = \frac{EP_i\%}{100} \cdot X_C$$

$$= \frac{2.7\%}{100} \cdot 1200 = 32 \text{ mg/L}$$

Puesto que $EP_s < E_A$, se puede estar seguro en un 95% que el error proporcional es aceptablemente pequeño para este método de glucosa.



4. Cálculo del error sistemático a partir de un estudio de comparación de métodos para la glucosa.

a. En la comparación de un método por glucosa oxidasa automatizado (y) versus el método de referencia nacional manual para la glucosa (x), se obtuvieron las siguientes estadísticas mediante el análisis de regresión lineal:

$y = 0.973 \cdot x - 57 \text{ mg/L}$, $s_{y,x} = 37 \text{ mg/L}$, $N = 82$, $\bar{x} = 1723$, $\bar{y} = 1619$, $s_x = 571 \text{ mg/L}$
(donde s_x es la desviación estándar de los valores x para las 82 muestras), y $r = 0.9941$.

b. Cálculo puntual del error sistemático (ES)

Considere el sesgo:

$$\text{Sesgo} = |\bar{y} - \bar{x}| = 104 \text{ mg/L}$$

El sesgo suministra un estimado del error sistemático en el promedio de los datos. Sin embargo, si x no es igual a la X_C de interés, no debe haber proporcional entre los métodos para que el sesgo suministre un estimado exacto del error sistemático a estas otras concentraciones. Si existe error proporcional, utilice las estadísticas de regresión lineal para calcular el sesgo usando sólo aquellas muestras cercanas a X_C .

Considere la regresión lineal:

$$\text{ES} = |\bar{Y}_C - \bar{X}_C|$$

donde $Y_C = a + b \cdot X_C$

Para

$$X_C = 1200 \text{ mg/L de glucosa}$$

Entonces

$$Y_C = 0.973 \times 1.200 - 57 \text{ mg/L}$$

$$= 1111 \text{ mg/L}$$

$$\text{y } \text{ES} = |1.111 - 1.200| = 89 \text{ mg/L}$$

Puesto que el $\text{ES} < \text{EA}$, el error sistemático es aceptable.

c. Cálculo del intervalo de confianza del error sistemático (ES_s , ES_i)

$$Y_{Cu} = Y_C + w$$

y

$$Y_{Cs} = Y_C - w$$



donde

$$w = t \cdot s_{y,x} \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{(X_c - \bar{X})^2}{\sum (x_i - \bar{X})^2}}$$

donde

$$\sum (x_i - \bar{X})^2 = s_x^2 (N - 1)$$

donde w es el ancho del intervalo de confianza alrededor de la línea de regresión (ver Fig. 22-8). El valor para t obtenido de una tabla t unilateral del 95% y $N - 2$ grados de libertad es de 1.66.

$$w = 1.66 \cdot 37 \sqrt{\frac{1}{82} + \frac{(1200 - 1723)^2}{571^2 \cdot 81}} = 9 \text{ mg/L}$$

por lo tanto

$$Y_{Cs} = 1.111 + 9 = 1120 \text{ mg/L}$$

$$Y_{Ci} = 1.111 - 9 = 1102 \text{ mg/L}$$

El límite que se desvía más del valor ideal para Y_C (idealmente $Y_C = X_C$) se usará para estimar el límite superior del error sistemático.

$$ES_u = |(Y_C + w) - X_C|_u$$

$$= |1.102 - 1.200| = 98 \text{ mg/L}$$

y

$$ES_i = |(Y_C + w) - X_C|_i$$

$$= |1.120 - 1.200| = 80 \text{ mg/L}$$

puesto que $ES_s < E_A$, podemos estar seguros en un 95% que el error sistemático es aceptable entre los dos métodos.

5. Cálculo del error total

a. Cálculo puntual del error total (ET)

$$ET = RE + ES \text{ (ver Fig. 22-6)}$$

$$= 4 \cdot s_{TM} + |Y_C - Y_{Ci}|$$

$$ET = 80 + 89 \text{ mg/L} = 169 \text{ mg/L}$$

Puesto que el $ET < E_A$, el error total del nuevo método de glucosa no es aceptable.



b. Cálculo del intervalo de confianza para el error total (ET_s , ET_i)

$$ET_s = \sqrt{ER_s^2 + w^2} + SE$$

y

$$ET_i = \sqrt{ER_i^2 + w^2} + SE$$

Observe que se suman las varianzas de la incertidumbre en mediciones repetitivas y la incertidumbre en la línea de regresión, y se calcula la raíz cuadrada de la suma para calcular la incertidumbre total la cual se combina después con el cálculo puntual del error sistemático para proporcionar un límite adecuado para el error total. Por lo tanto,

$$ET_s = \sqrt{109^2 + 9^2} + 89 = 198 \text{ mg/L}$$

y

$$ET_i = \sqrt{64^2 + 9^2} + 89 = 154 \text{ mg/L}$$

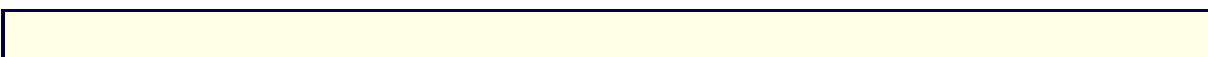
Puesto que el $ET_i > E_A$, estamos seguros en un 95% de que el error total no es aceptable. Aunque los dos componentes del error-aleatorio y sistemático-son bastante grandes, los errores que se pueden reducir o eliminar con mayor facilidad son los errores sistemáticos. Sin embargo, en este ejemplo, tanto el RE_s , como ES_s son individualmente casi tan grandes como el E_A (120 mg/L). Es preciso tomar medidas para reducir ambos tipos de errores, antes de que el método automatizado sea aceptable.

Referencias

1. Health Care Financing Administration (42 CFR Part 405, et al.), the Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services: Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988, Final Rule; *Fed Reg* 57:7003-7288, Feb 28, 1992.
2. Westgard JO: Precision and accuracy: concepts and assessment by method evaluation testing, *CRC Crit Rev Clin Lab Sci*, pp 283-330, Boca Raton, Fla., 1981, CRC Press.
3. Westgard JO, de Vos DJ, Hunt MR, et al: Concepts and practices in the selection and evaluation of methods, *Am J Med Technol*: Part I, Background and approach, 44:290-300, 1978; Part II, Experimental procedures, 44:420-430, 1978; Part III, Statistics, 44:552-571, 1978; Part IV, Decision on acceptability, 44:727-742, 1978; Part V, Applications, 44:803-813, 1978.
4. National Committee for Clinical Laboratory Standards: *NCCLS proposed guideline EP5-T2, Proposed guidelines for user evaluation of precision performance of clinical chemistry devices*, Subcommittee for User Evaluation of Precision of the Evaluation Protocols Area Committee, Villanova, Penn., 1992, NCCLS.
5. National Committee for Clinical Laboratory Standards: *NCCLS proposed guideline EP6-P, Evaluation of the linearity of quantitative analytical methods*, Subcommittee on Linearity Performance of the Evaluation Protocols Area Committee, Villanova, Penn., 1986, NCCLS.
6. National Committee for Clinical Laboratory Standards: *NCCLS proposed guideline EP7-P, Interference testing in clinical chemistry*, Subcommittee on Interference Testing of the Evaluation Protocols Area Committee, Villanova, Penn., 1986, NCCLS.
7. National Committee for Clinical Laboratory Standards: *NCCLS proposed guideline EP9-T, User comparison of quantitative clinical laboratory methods using patient samples*, Subcommittee on User



- Comparison of Methods of the Evaluation Protocols Area Committee, Villanova, Penn., 1993, NCCLS.
8. National Committee for Clinical Laboratory Standards: *NCCLS tentative guideline EP10-T, preliminary evaluation of quantitative clinical methods, ed 2, tentative guideline*, Evaluation Protocols Area Committee, Villanova, Penn., 1993, NCCLS.
 9. Labeling requirements and standards development for in-vitro diagnostic products, *Fed Reg* 21 CFR:809-810, 1974.
 10. Draft guidance to manufacturers of in vitro analytical test systems for preparation of premarket submissions implementing CLIA '88, *Fed Reg*, pp 3592ff, Jan 12, 1993.
 11. Berkow R, editor: *The Merck manual of diagnosis and therapy*, ed 16, Rahway, N.J., 1992, Merck Sharp & Dohme Research Laboratories, p 1129.
 12. Barnett RN: Medical significance of laboratory results, *Am J Clin Pathol* 50:671-676, 1968.
 13. Barnett RN: Analytic goals in clinical chemistry: the pathologist's viewpoint. In Elevitch FR, editor: *Proceedings of the 1976 Aspen conference on analytic goals in clinical chemistry*, Skokie, Ill., 1977, College of American Pathologists, pp 20-24.
 14. Tonks D: A study of the accuracy and precision of clinical chemistry determinations in 170 Canadian laboratories, *Clin Chem* 9:217-233, 1963.
 15. Tonks D: A quality control program for quantitative clinical chemistry estimations, *Can J Med Technol* 30:38-54, 1968.
 16. Gilbert R: Progress and analytic goals in clinical chemistry, *Am J Clin Pathol* 63:960-973, 1975.
 17. Cotlove E, Harris E, Williams G: Biological and analytic components of variation in long-term studies of serum constituents in normal subjects. III. Physiological and medical implications, *Clin Chem* 16:1028-1032, 1970.
 18. Elevitch FR, editor: *CAP Aspen Conference 1976: analytical goals in clinical chemistry*, Skokie, Ill., 1977, College of American Pathologists.
 19. Elion-Gerritzen WE: Analytic precision in clinical chemistry and medical decisions, *Am J Clin Pathol* 73:183-195, 1980.
 20. Ross JW: Blood gas internal quality control, *Pathologist* 34:377-379, 1980.
 21. Fraser CG: The application of theoretical goals based upon biological variation in proficiency testing, *Arch Pathol Lab Med* 112:404-415, 1988.
 22. Fraser CG: Desirable standards of performance for therapeutic drug monitoring, *Clin Chem* 33:387-389, 1987.
 23. Fraser CG, Petersen PH, Ricos C, Haeckel R: Quality specifications. In Haeckel R, editor: *Evaluation methods in laboratory medicine*, New York, 1993, VCH Publishers.
 24. Ehrmeyer SS, Laessig RH, Leinweber JE, Oryall JJ: 1990 Medicare/CLIA final rules for proficiency testing: minimum intralaboratory performance characteristics (CV and bias) needed to pass, *Clin Chem* 36:1736-1740, 1990.
 25. Westgard JO, Burnett RW: Precision requirements for cost-effective operation of analytical processes, *Clin Chem* 36:1629-1632, 1990.
 26. National Reference System for the Clinical Laboratory, NRSCL6-T, *Development of methodological principles documents for analytes in the clinical laboratory: tentative guideline*, National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Penn., 1989, NRSCL.
 27. Tremblay MM: Evaluation of instruments in biochemistry, *Can J Med Technol* 41:65-76, 1979.
 28. Shaikh AH: A systematic procedure for selection of automated instruments in the clinical laboratory, *Am J Med Technol* 45:710-714, 1979.
 29. Buttner R, Borth R, Boutwell JH, et al: Approved recommendation (1978) on quality control in clinical chemistry. Part 1. General principles and terminology, *Clin Chim Acta* 98:129F-143F, 1979.
 30. Westgard JO, Hunt MR: Use and interpretation of common statistical tests in method-comparison studies, *Clin Chem* 19:49-57, 1973.
 31. American Society for Testing and Materials: *ASTM Standard E178-68: standard recommended practice*

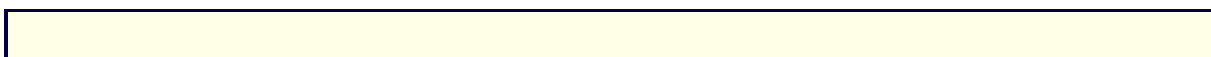


- for dealing with outlying observations, Philadelphia, 1968, ASTM.
32. Waakers PJM, Hellendoorn HBA, Op De Weegh GJ, Heerspink W: Applications of statistics in clinical chemistry: a critical evaluation of regression lines, *Clin Chim Acta* 64:173-184, 1975.
 33. Cornbleet PJ, Gochman N: Incorrect least-squares regression coefficients in method-comparison analysis, *Clin Chem* 25:432-438, 1979.
 34. Westgard JO, Carey RN, Wold S: Criteria for judging precision and accuracy in method development and evaluation, *Clin Chem* 20:825-833, 1974.
 35. Natrella MG: *Experimental statistics*, National Bureau of Standards Handbook 91, Washington, D.C., 1963, US Government Printing Office.
 36. Krouwer J: A multifactor experimental design for evaluating random access analyzers, *Clin Chem* 34:1984-1986, 1988.
 37. Passing H, Bablock W: Comparison of several regression procedures for method comparison studies and determination of sample sizes, *J Clin Chem Clin Biochem* 22:431-445, 1984.

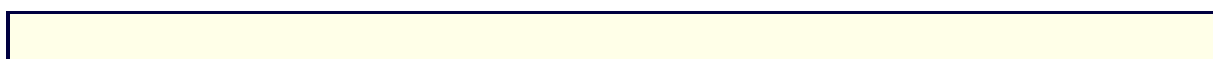
Tablas

Tabla 22-1. Consideraciones en el proceso de la selección de métodos.

Compuesto analizado	Criterios de desempeño aceptables, CLIA '88	Nivel de Decisión (X_c^*)	Error permisible (CLIA '88 [†])	Desviación estándar máxima (CLIA '88 [‡])	Desviación estándar máxima basada en criterios médicos (Fraser [§])
Química Rutinaria					
Albúmina	±10%	3.5 g/dL	0.35	0.09	0.05
Bilirrubina	±0.4 mg/dL o	1.0 mg/dL	0.40	0.10	0.11
	±20%	20 mg/dL	4.0	1.0	2.2
Calcio	±1.0 mg/dL	7.0 mg/dL	1.0	0.25	0.08
		10.8 mg/dL	1.0	0.25	0.10
		13.0 mg/dl	1.0	0.25	0.12
Cloruro	±5%	90 mmol/L	4.5	1.1	0.63
		110 mmol/L	5.5	1.4	0.77
Colesterol	±10%	200 mg/dL	20	5.0	5.4
Creatinina	±0.3 mg/dL o	1.0 mg/dL	0.30	0.08	0.02
	±15%	3.0 mg/dL	0.45	0.11	0.07
Glucosa	±6 mg/dL o	50 mg/dL	6.0	1.5	1.1
	±10%	120 mg/dL	12	3.0	2.6
		200 mg/dL	20	5.0	4.4
Hierro	±20%	150 mg/dL	30	7.5	24

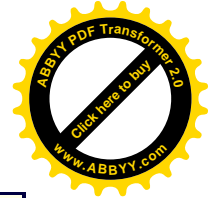


Magnesio	±25%	2.0 mg/dL	0.50	0.12	0.02
pH	±0.04	7.35	0.04	0.01	0.01
PCO ₂	±5mm Hg o ±8%	35 mm Hg 50 mm Hg	5.0 5.0	1.2 1.2	0.84 1.2
PO ₂	±3 DE	30 mm Hg 80 mm Hg	3 DE 3 DE	0.75 DE 0.75 DE	
Potasio	±0.5 mmol/L	3.0 mmol/L 6.0 mmol/L	0.50 0.50	0.12 0.12	0.07 0.14
Proteínas totales	±10%	7.0 g/dL	0.70	0.18	0.10
Sodio	±4 mmol/L	130 mmol/L 150 mmol/L	4.0 4.0	1.0 1.0	0.38 0.44
Triglicéridos	±25%	160 mg/dL	40	10	18
Nitrógeno úrico	±2 mg/dL o ±9%	27.0 mg/dL	2.4	0.6	1.7
Acido Úrico	±17%	6.0 mg/dL	1.0	0.25	0.25
Enzimas					
Fosfatasa alcalina	±30%	150 U/L		45 11	5.1
ALAT	±20%	50 U/L	10	2.5	6.8
Amilasa	±30%	100 U/L	30	7.5	3.7
ASAT	±20%	30 U/L 70 U/L	6.0 14	1.5 3.5	2.2 5.0
CC	±30%	200 U/L	60	15	40
LD	±20%	300 U/L	60	15	12
Endocrinología					
Cortisol	±25%	5 µg/dL 30 µg/dL	1.25 7.5	0.3 1.8	
Tiroxina libre	±3 DE	2.3 ng/dL	3 DE	0.75 DE	0.1
GCH	±3 DE o positivo/ negativo	25 UI/L	3	0.75 DE	
Captación de	±3 DE	25%	3 DE	0.75 DE	



T3					
Triyodo- tironina	±3 DE	100 ng/dL 200 ng/dL	3 DE 3 DE	0.75 DE 0.75 DE	4.0 8.0
TSH	±3 DE	0.1 mUI/L 5.0 mUI/L	3 DE 3 DE	0.75 DE 0.75 DE	0.025 0.4
Tiroxina	±1.0 mg/dL o ±20%	3 µg/dL 13 µg/dL	1.0 2.6	0.25 0.65	0.1 0.45
Toxicología					
Alcohol sanguíneo	±25%	0.1 g/dL	0.025	0.006	
Plomo en sangre	±4 µg/dL o ±10%	10 mg/dL 40 mg/dL	4.0 4.0	1.0 1.0	
Carba- mazepina	±25%	8 mg/L 12 mg/L	2.0 3.0	0.5 0.8	0.8 1.2
Digoxina	±0.2 mg/L o ±20%	0.8 mg/L 2.0 mg/L	0.2 0.4	0.05 0.10	0.04 0.10
Etosuximida	±20%	40 mg/L 100 mg/L	8.0 20.0	2.0 5.0	2.0 4.9
Gentamicina	±25%	10 mg/L	2.5	0.6	
Litio	±0.3 mmol/L o ±20%	0.5 mmol/L 1.5 mmol/L	0.3 0.3	0.08 0.08	0.06 0.18
Fenobarbital	±20%	15 mg/L 40 mg/L	3.0 8.0	0.75 2.0	1.3 3.6
Fenitoína	±25%	10 mg/L 20 mg/L	2.5 5.0	0.6 1.2	0.7 1.3
Primidona	±25%	5 mg/L 12 mg/L	1.2 3.0	0.3 0.75	0.56 1.36
Procainamida	±25%	4 mg/L 20 mg/L	1.0 5.0	0.25 1.25	
Quinidina	±25%	7 mg/L	1.8	0.45	
Teofilina	±25%	10 mg/L 20 mg/L	2.5 5.0	0.6 1.2	0.7 1.4
Acido Valproico	±25%	50 mg/L 100 mg/L	12 25	3.0 6.2	3.3 6.7

SESgo, Alanina aminotransferasa; ASAT, aspartato aminotransferasa; CC, creatina cinasa; CLIA,



Ley de Mejoramiento de los Laboratorios Clínicos; *GCH*, gonadotropina coriónica humana; *UI*, unidades internacionales, *LD*, deshidrogenasa láctica; *DE*, desviación estándar; *T₃*, triyodotironina; *TSH*, hormona estimulante de la tiroides; *U*, unidades X_C , concentración del analito x que indica una intervención médica.

* Niveles de decisión médica, la mayoría basados en Barnett. [refs\(460\)](#)

† Error permitido basado en los requerimientos de rendimiento expuestos en CLIA'88 al nivel de decisión médica [respectivo](#)¹. Los límites de la DE se basan en los datos de grupos similares.

‡ DE interna máxima basada en el criterio que 4 DE es menos que el error permitido [refs\(461\)](#) (ver columna 3 para las unidades).

§ DE interna máxima basada en criterios de biovariabilidad (Fraser et al [refs\(462\)](#)) (ver columna 3 para las unidades).

Tabla 22-2. Criterios de estimadores puntuales para un rendimiento aceptable.

Tipo de error	Criterios
Aleatorio (RE)	$4 \cdot s_{TM} < E_A$
Constante (EC)	$Sesgo < E_A$
Proporcional (EP)	$\frac{ R - 100 }{100} \cdot X_C < E_A$
Sistemático (ES)	Si $X = X_C$, $ \bar{Y} - \bar{X} < E_A$ o $ Y_C - X_C = a + bX_C - X_C < E_C$
Total (ET)	$RE + ES = 4 \cdot s_{TM} + a + bX_C - X_C < E_A$

Tabla 22-3. Factores para calcular los límites de confianza unilaterales para la desviación estándar.

Grados de Libertad (N - 1)	$A_{.05}$	$A_{.95}$
1	.5103	15.947
5	.6721	2.089
10	.7391	1.593
15	.7747	1.437
20	.7979	1.358
25	.8149	1.308



30	.8279	1.274
40	.8470	1.228
50	.8606	1.199
60	.8710	1.179
70	.8793	1.163
80	.8861	1.151
90	.8919	1.141
100	.8968	1.133

Tabla 22-4. Criterios de estimadores puntuales para un rendimiento aceptable.

Error	Rendimiento aceptable	Rendimiento inaceptable
Aleatorio (RE)	$4 \times s_{TMu} < E_A$	$4 \times s_{TMi} < E_A$
Constante (EC)	$ \text{Sesgo} + \frac{t \cdot s}{\sqrt{N}} < E_A$	$ \text{Sesgo} - \frac{t \cdot s}{\sqrt{N}} < E_A^*$
Proporcional (EP)	$\frac{ \bar{R}_u \text{ o } \bar{R}_i - 100 _u}{100} \cdot X_C < E_A$	$\frac{ \bar{R}_i \text{ o } \bar{R}_u - 100 _i}{100} \cdot X_C < E_A^*$
Sistemático (ES)	$ (a + bX_c \pm w) - X_{cli} < E_A$	$ (a + bX_c \pm w) - X_{cli} < E_A^*$
Error total (ET)	$(REs^2 + w^2)^{1/2} + SE < E_A$	$(RE_i^2 + w^2)^{1/2} + SE < E_A^*$
*Si el valor ideal se encuentra entre los dos límites, es posible que no haya error, y por tanto, el límite inferior del error puede ser cero. Por lo tanto, en estos casos, el EC_i se define como cero, o el EP_i se redefine como cero, o el ES_i se redefine como cero, cualquiera que sea el caso. Si $ES_i = 0$, el ET_i se vuelve RE_i .		

Figuras

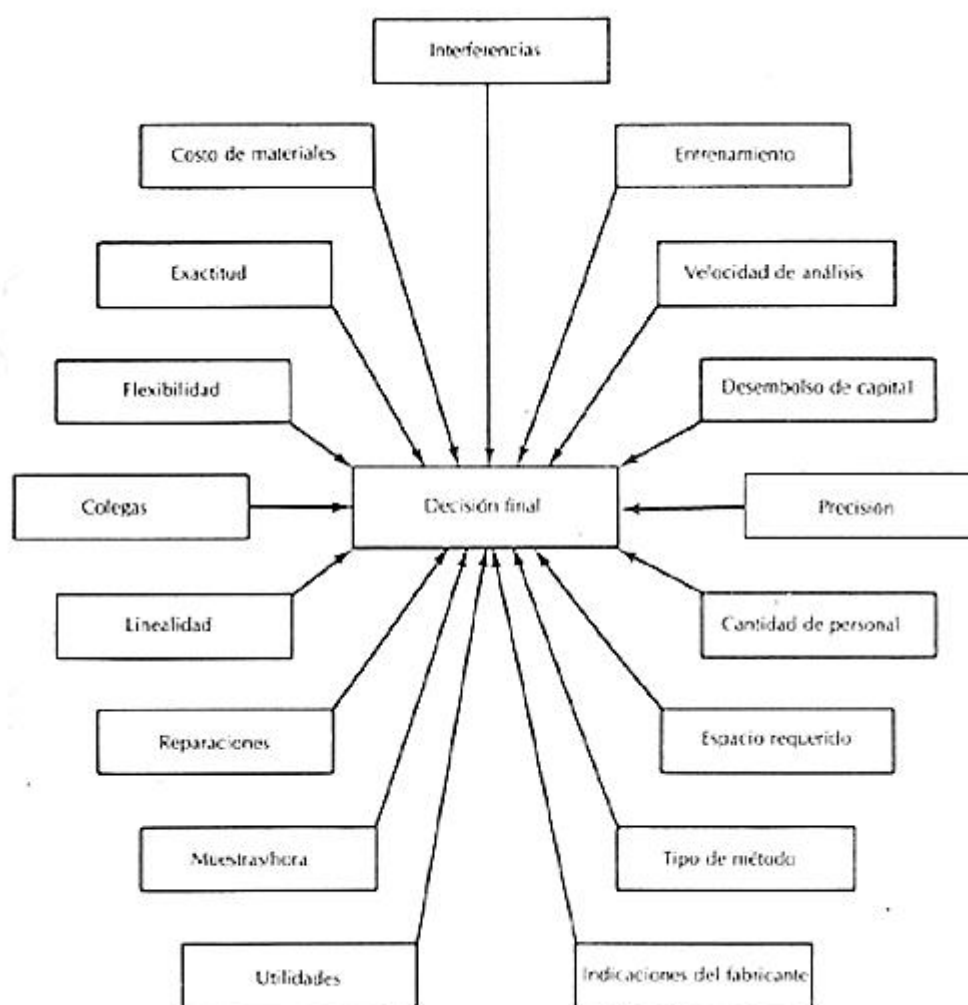


Figura 22-1

Factores que intervienen en el método de selección

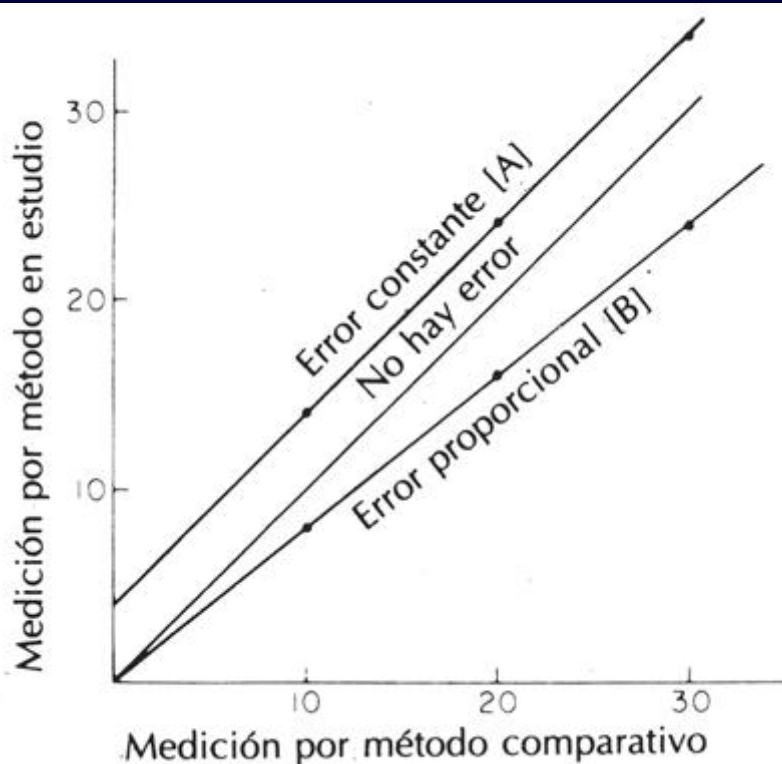


Figura 22-2

Errores constantes y proporcionales (De Westgard JO, de Vos DJ, Hunt MR, et al: *Am J Med Technol* 44:290, 1978.)

Tipo de error analítico	Experimentos de evaluación	
	Preliminares	Finales
Error aleatorio	Replicación intracorrida Materiales puros Muestras reales	Replicación intercorrida Muestras reales
Error constante	Interferencia	Comparación con método comparativo
Error proporcional	Recuperación	

Figura 22-3

Experimentos específicos de evaluación para estimar los tipos específicos de error analítico. (De Westgard JO, de Vos DJ, Hunt MR, et al: *Am J Med Technol* 44:290, 1978.)

Estadística	Intervalo de concentraciones estudiado		
	0-1,5 mg/dl	0-2,5 mg/dl	0-4,5 mg/dl
r	0,773	0,878	0,950
Desviación	0,17	0,17	0,17
s_d	0,30	0,29	0,31
$s_{y/x}$	0,29	0,29	0,31
a	0,17	0,17	0,20
b	1,025	1,007	0,966

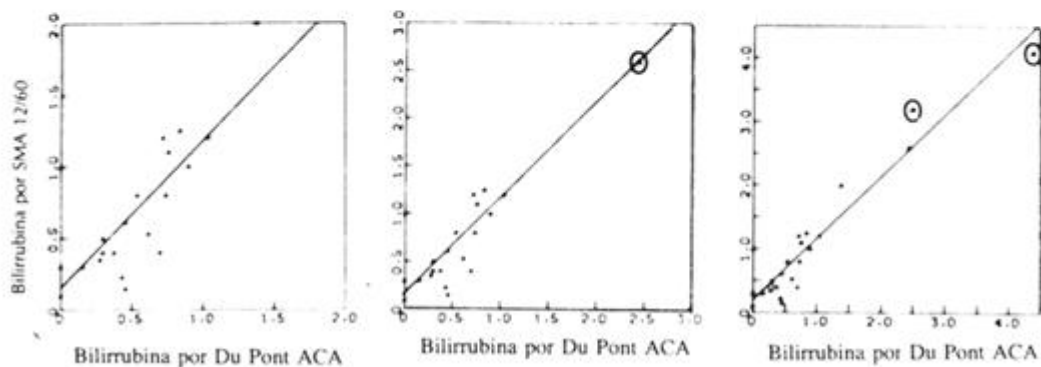
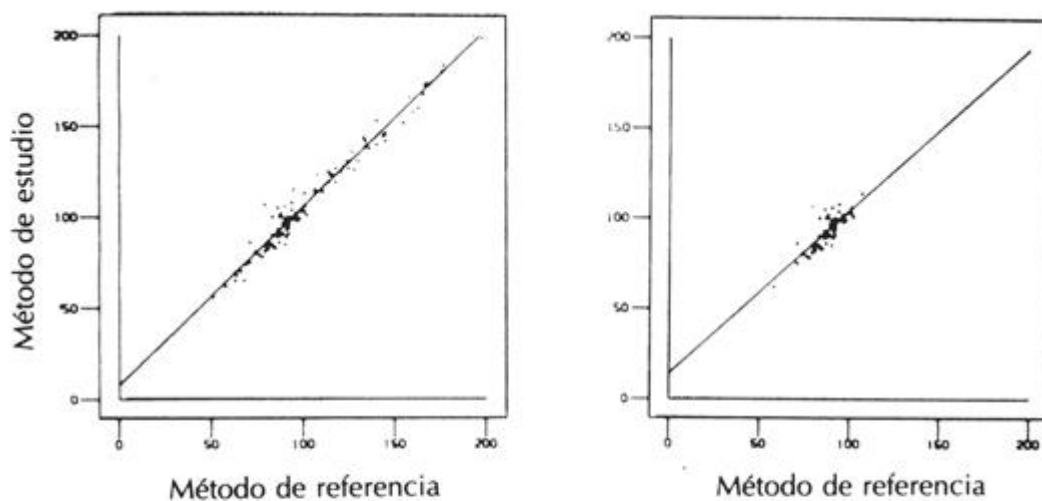


Figura 22-4

Efecto del rango de los datos en el coeficiente de correlación, r . (De Westgard JO, de Vos DJ, Hunt MR, et al: *Am J Med Technol* 44:552, 1978.)



Intervalo	0 a 200	70 a 110
N	105	60
Pendiente	0,977	0,904
Intersección de Y	7,63	13,81
Error estándar	5,36	5,65

Figura 22-5

Efecto del rango de los datos en la regresión lineal estadística. (De Westgard JO, Hunt MR: *Clin Chem* 19:49, 1973.)

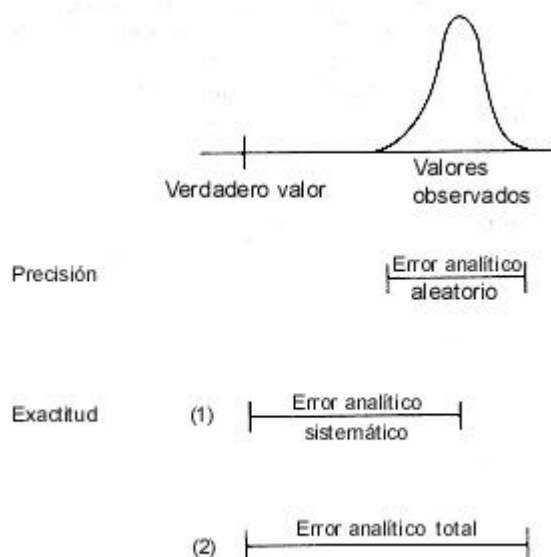


Figura 22-6

Error analítico total. (De Westgard JO, Carey RN, Wold S: *Clin Chem* 20:825, 1974.)

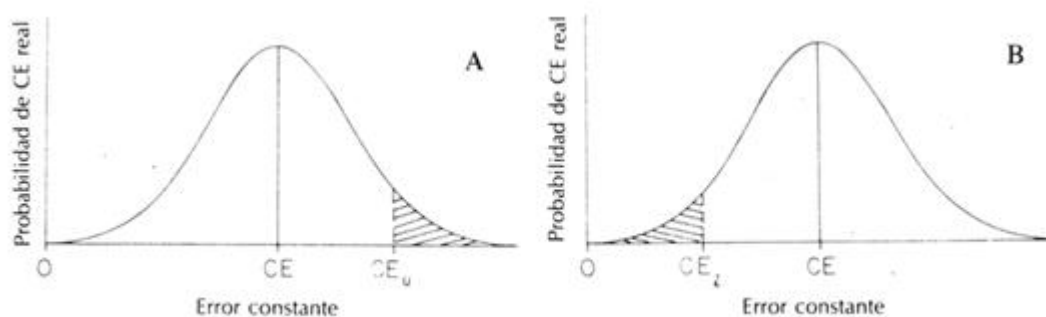


Figura 22-7

A, Límite superior al 95% de la constante de error de una cola, CE_u . **B**, Límite inferior al 95% de la constante de error de una cola, CE_l .

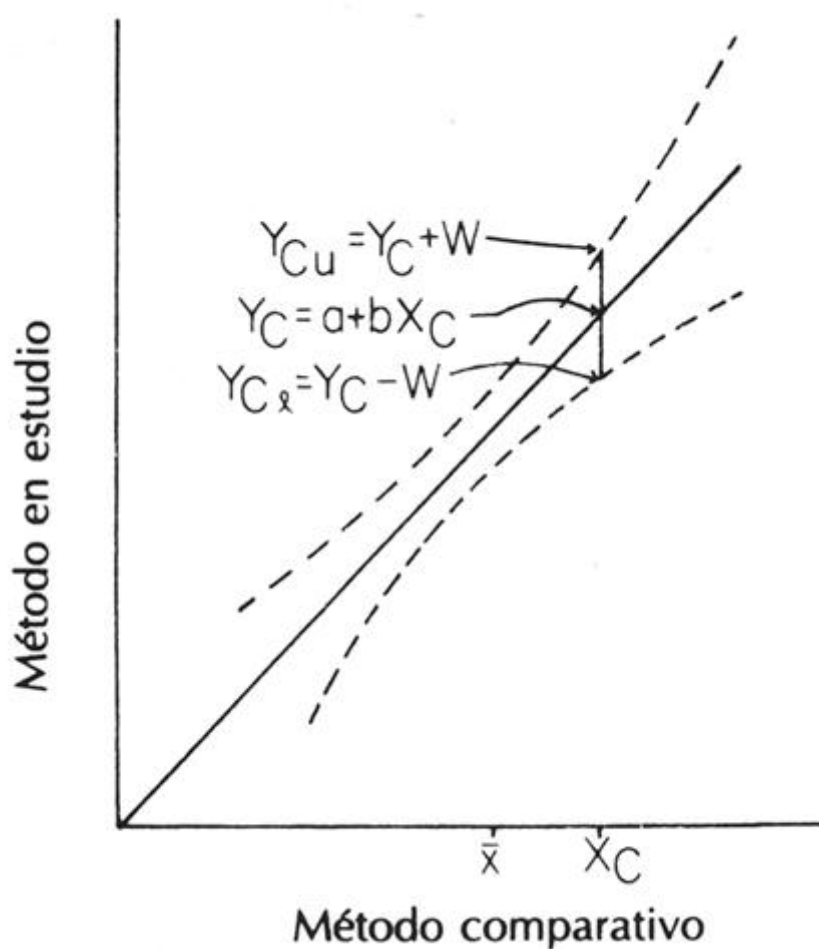


Figura 22-8

Intervalo de confianza alrededor de la línea de regresion.(De Westgard JO, de Vos DJ, Hunt MR, et al: *Am J Med Technol* 44:727, 1978.)

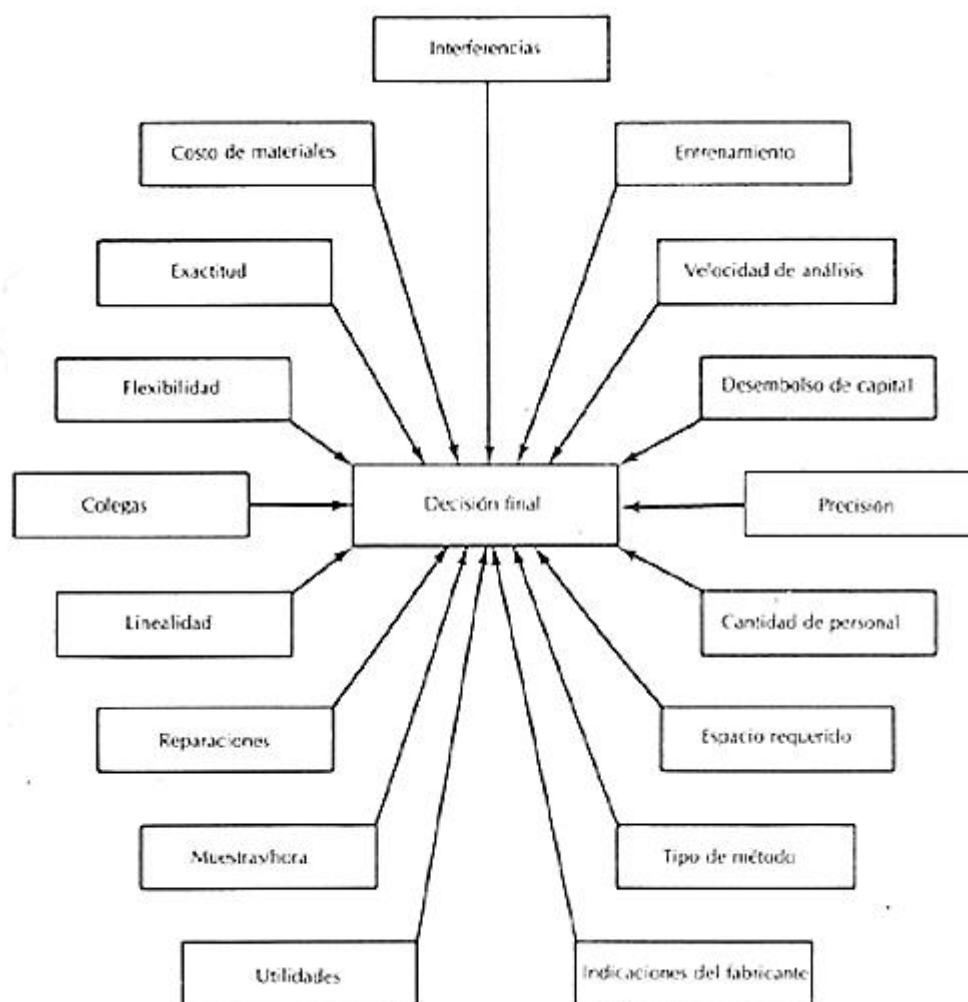


Figura 22-1 Factores que intervienen en el método de selección

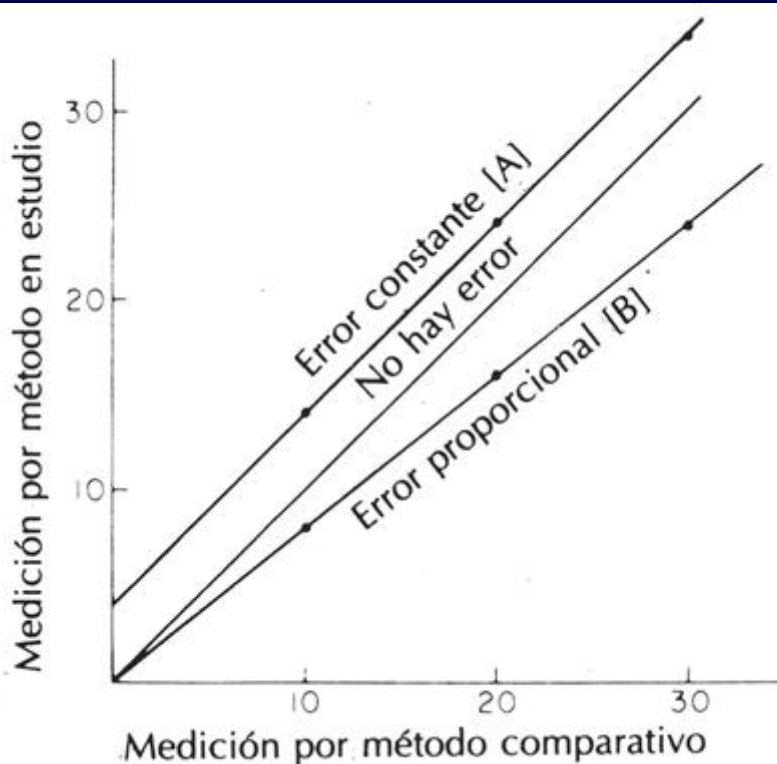


Figura 22-2 Errores constantes y proporcionales (De Westgard JO, de Vos DJ, Hunt MR, et al: *Am J Med Technol* 44:290, 1978.)

Tipo de error analítico	Experimentos de evaluación	
	Preliminares	Finales
Error aleatorio	Replicación intracorrida Materiales puros Muestras reales	Replicación intercorrida Muestras reales
Error constante	Interferencia	Comparación con método comparativo
Error proporcional	Recuperación	

Figura 22-3 Experimentos específicos de evaluación para estimar los tipos específicos de error analítico.(De Westgard JO, de Vos DJ, Hunt MR, et al: *Am J Med Technol*

44:290, 1978.)

Estadística	Intervalo de concentraciones estudiado		
	0-1,5 mg/dl	0-2,5 mg/dl	0-4,5 mg/dl
r	0,773	0,878	0,950
Desviación	0,17	0,17	0,17
s_d	0,30	0,29	0,31
$s_{y/x}$	0,29	0,29	0,31
a	0,17	0,17	0,20
b	1,025	1,007	0,966

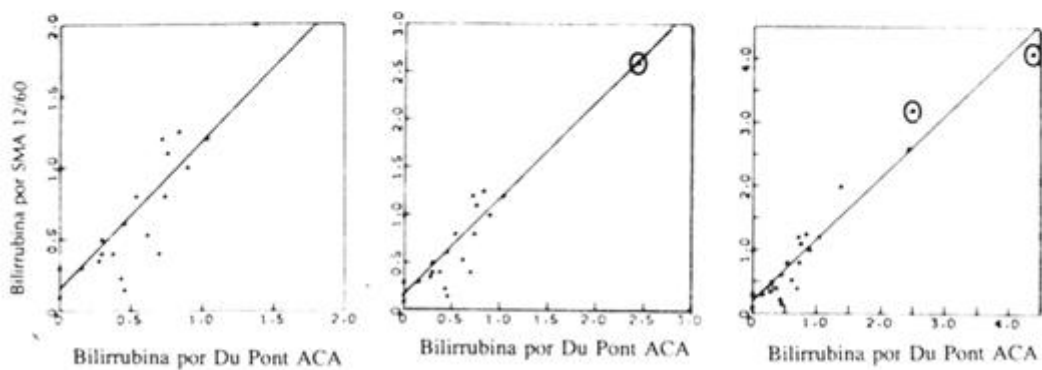
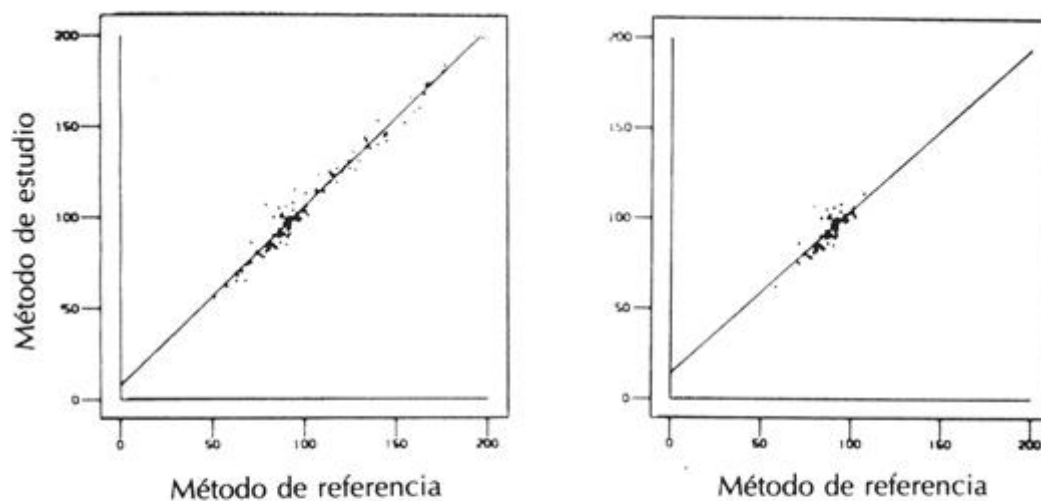


Figura 22-4 Efecto del rango de los datos en el coeficiente de correlación, r. (De Westgard JO, de Vos DJ, Hunt MR, et al: *Am J Med Technol* 44:552, 1978.)



Intervalo	0 a 200	70 a 110
N	105	60
Pendiente	0,977	0,904
Intersección de Y	7,63	13,81
Error estándar	5,36	5,65

Figura 22-5 Efecto del rango de los datos en la regresión lineal estadística. (De Westgard JO, Hunt MR: *Clin Chem* 19:49, 1973.)

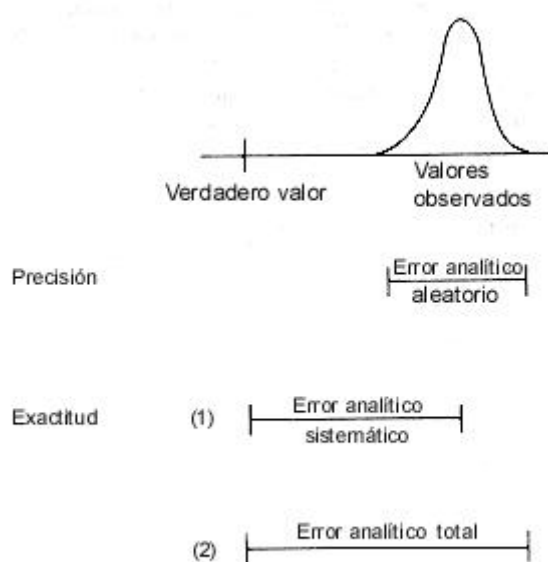


Figura 22-6 Error analítico total. (De Westgard JO, Carey RN, Wold S: *Clin Chem*

20:825, 1974.)

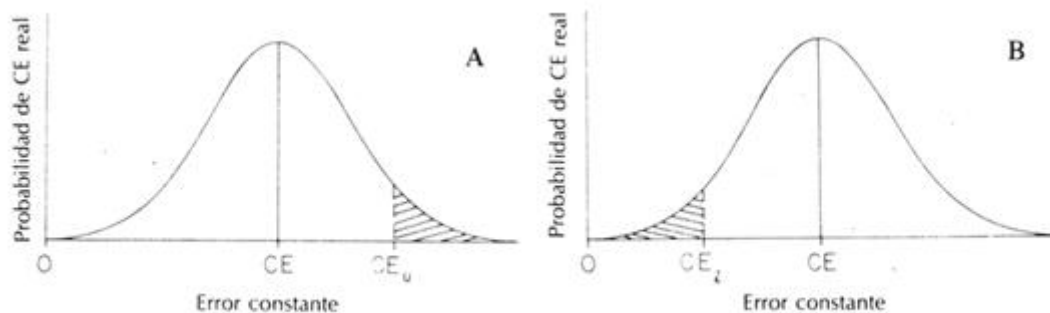


Figura 22-7 A, Límite superior al 95% de la constante de error de una cola, CE_u . B, Límite inferior al 95% de la constante de error de una cola, CE_l .

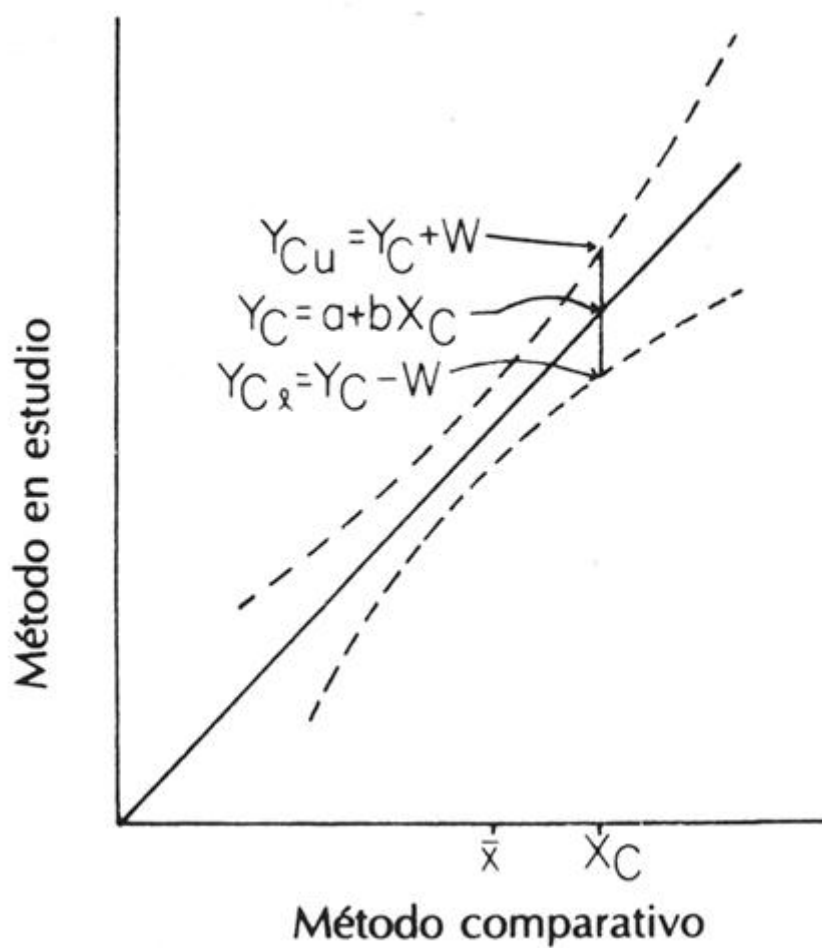


Figura 22-8 Intervalo de confianza alrededor de la línea de regresión.(De Westgard



JO, de Vos DJ, Hunt MR, et al: *Am J Med Technol* 44:727, 1978.)

CAPÍTULO 23

23. Interferencias en el Análisis Químico

Lawrence A. Kaplan

Amadeo J. Pesce

Limitaciones de los detectores

Espectrofotómetro de absorción

Espectrofotómetro de fluorescencia

Interferencias in vitro

Interferencias espectrales

Corrección de interferencias espectrales

Interferencias químicas

Corrección de interferencias químicas

Interferencias cromatográficas

Interferencias inmunoquímicas

Interferencias in vivo

Fármacos

Material de referencia de las fuentes interferentes

Evaluación de la interferencia analítica

Interferencia permisible

OBJETIVOS

- Entender como la exactitud de los resultados analíticos es mejorada al reducir errores de los interferentes en la instrumentación, metodología y muestreo.
- Estar consciente de las limitaciones en la exactitud analítica.
- Ser capaz de discutir los niveles de inexactitud que pueden tolerarse en los datos del laboratorio.

Términos clave

análisis bicromático Monitoreo espectrofotométrico de una reacción a dos longitudes de onda. Usado para corregir el color de fondo.

análisis cinético Análisis en el cual el *cambio* del parámetro que se está controlando con respecto al tiempo está relacionado con la concentración, como el cambio de absorbancia por minuto. Las mediciones son hechas muy tempranamente en el período de reacción.

análisis de punto final Monitoreo de una reacción después de que ésta se ha completado esencialmente.



AARH Anticuerpo humano anti-ratón encontrado en suero de individuos.

blanco de muestra Muestra más diluyente; usada para corregir la absorbancia de la mezcla completa de reacción para el color endógeno de la muestra.

blanco de reactivo La mezcla de reacción menos la muestra: usado para restar el color del reactivo endógeno de la absorbancia de la reacción completa (más la muestra).

corrección de Allen Análisis multicromático de una reacción para corregir la absorbancia de fondo. Además de la A_{max} (absorbancia máxima) del cromóforo, se monitorean dos longitudes de onda para restar la absorbancia de fondo promedio.

hemólisis Ruptura de los glóbulos rojos, in vitro o in vivo. La hemólisis puede dar a la muestra de plasma un color rojo.

ictericia Referente al color anaranjado impartido a la muestra debido a la presencia de bilirrubina.

interferente Cualquier fenómeno químico o físico que pueda interferir o detener una reacción o proceso.

interferente in vitro Un interferente que no es causado por ningún proceso fisiológico in situ. También llamado interferente exógeno.

interferente in vivo Un proceso interferente que resulta de procesos fisiológicos dentro del cuerpo. También llamado interferente endógeno.

interferente químico Compuesto que produce ya sea un color endógeno o interfiere directamente en la reacción o proceso que está siendo controlado.

lipemia Presencia de partículas de lípidos (generalmente lipoproteínas de muy baja densidad) en la muestra, que le dan a la muestra un aspecto turbio.

turbidez Dispersión de luz en un líquido que contiene partículas suspendidas.

ventana Término usado para denotar un tiempo específico durante el cual se monitorean las reacciones, puede observarse un fenómeno, o puede iniciarse un procedimiento

FIPD Factor inmunoreactivo parecido a la digoxina. Una sustancia endógena que reacciona cruzadamente con los anticuerpos de digoxina.

Un laboratorio químico usa diversas técnicas para medir concentraciones de sustancias bioquímicas específicas. Todas estas técnicas están sujetas a interferencias provenientes de una variedad de fuentes. Las interferencias específicas que afectan una técnica pueden no ser importantes para otra. Sin embargo, hay conceptos generales que, cuando son entendidos, ayudan a controlar y minimizar los efectos de las interferencias sobre la exactitud y precisión del método.

Hay cuatro tipos básicos de interferencias en el análisis de laboratorio: (1) aquellas que provienen de las limitaciones de los detectores; (2) sustancias químicas en la muestra que interfieren directamente con el método analítico; (3) estados de enfermedad o agentes exógenos que modifican ciertos procesos fisiológicos, cambiando así las concentraciones del compuesto analizado in vivo; y (4) aquellas que ocurren como resultado del procesamiento de la muestra (sangre).

Limitaciones de los Detectores

Los métodos que dan respuestas cuantitativas comúnmente emplean un detector, como un



espectrofotómetro. Es posible obtener una relación entre la respuesta del detector y las concentraciones de los compuestos analizados en varias muestras. En el caso de la espectrofotometría de absorción, hay una relación logarítmica compleja entre la concentración y la respuesta del detector (ver Capítulo 4). Cuando se usa fluorescencia, existe una relación lineal entre la concentración y la señal fluorescente. Similarmente, las respuestas también son lineales cuando son usadas otras propiedades ópticas por los detectores, como el índice de refracción, o propiedades electroquímicas, como la corriente iónica de la oxidación. Es importante tener conocimiento del tipo de relación que existe entre la respuesta del detector y la concentración.

La primera sección describe los errores en la espectrofotometría de absorción. Es importante entender los problemas de interferencia asociados con este modo de medición, debido a que el laboratorio químico clínico cuantifica muchos de sus compuestos por esta técnica. Debido a que la naturaleza y sofisticación del laboratorio cambia, otros tipos de interferencias podrían llegar a ser importantes de considerar cuando uno desempeña un análisis de laboratorio.

Espectrofotómetro de absorción

Hay dos tipos de errores correlacionados en la medida espectrofotométrica. El primero es causado por la naturaleza de la relación matemática entre la absorbancia y el porcentaje de transmitancia, y la segunda está relacionada con las limitaciones del instrumento.

Variación de la absorbancia.

Como se discutió en el Capítulo 4, hay una relación logarítmica entre el porcentaje de transmitancia (%T), que es la cantidad realmente medida y la absorbancia (A), que es calculada. La Fig.23-1 muestra la relación entre las escalas lineal del porcentaje de transmitancia y logarítmica de la absorbancia. A porcentajes muy bajos de transmitancia, pequeños cambios en el porcentaje de transmitancia, provocarán grandes cambios en la absorbancia. Por ejemplo, un cambio en el porcentaje de transmitancia de 60% a 50% T provoca solamente un pequeño cambio de absorbancia de aproximadamente 0.08 A. Un cambio en el porcentaje de transmitancia de 15% a 5% T, sin embargo, provoca un cambio de absorbancia de 0.65 A. Así, pequeños cambios de porcentaje de T a una transmitancia muy baja resultarán en cambios desproporcionadamente grandes en la absorbancia calculada en esta parte de la escala y conducirán a un error aumentado del análisis.

Se puede considerar el error de una medición espectrofotométrica como una función de la desviación total o la escala completa del medidor de detección o su electrónica. Cuando la escala de absorbancia se fija en 0.000 o la escala de transmitancia es ajustada a 100%, se obtiene la señal electrónica máxima. Para el análisis del error, la variación en esta medición se supone constante a lo largo de todas las lecturas sobre la escala. Como el porcentaje de T refleja directamente la señal eléctrica, se pueden hacer algunos cálculos simples usando el porcentaje de T. A la máxima desviación de la escala (100% de T), una variación de 1% en el porcentaje de T significa un error de $\pm 1\%$ T. A la mitad de la escala, una variación de 1% del valor 50% T significa un 2 % de error absoluto (1/50), y a 10% T, esto llega a ser un 10% de error (1/10). Sin embargo, no es el porcentaje T el que es directamente proporcional a la concentración, sino la absorbancia. Uno puede convertir esos valores de porcentaje de T en absorbancia y calcular el error (Tabla 23-1).



Como la conversión de porcentaje de T a absorbancia es una función logarítmica, ambos extremos de la escala, 0.000 absorbancia y a una alta absorbancia (más de 1.0), tienen los mayores errores. En términos simples, cuando la solución tiene poco color, es difícil decir la diferencia entre ausencia de color y algún color. El error relativo puede ser enorme debido a que esta diferencia es muy pequeña. En absorbancias altas no es fácil de registrar exactamente una cantidad pequeña de luz que pasa a través de la solución. Por consiguiente, las diferencias entre los dos valores son minúsculas comparadas con la incidencia total de luz usada para calibrar el 100% T, y es difícil medir estos pequeños cambios.

En la Fig. 23-2 se muestra el error relativo de las mediciones espectrofotométricas versus el porcentaje de transmitancia y absorbancia. Se deben hacer la mayoría de las medidas a absorbancias entre 0.1 y 1.1 para minimizar este tipo de error.

Limitaciones del instrumento.

Considere como funciona un espectrofotómetro. A 100% de T, o cero de absorbancia, toda la señal de luz es convertida en una señal electrónica. Suponga que esta señal mide 1000 nanoamperios (nA). Si la absorbancia cambia por 0.010, hay una disminución a 990 nA, y el instrumento debe medir exactamente 10/1000 nA, o un cambio de 1% en la señal. Para hacer esto exactamente (1%), debe medir la señal a ± 0.10 nA (1% de 10). Así, a cero de absorbancia existe la dificultad de una medición exacta de una parte en 10,000 de la señal. De lo contrario, si la absorbancia es 2.0, la señal en el fotomultiplicador es solamente 10 nA porque solo un 1% de la luz alcanza el fotodetector. Para alcanzar el mismo grado de exactitud entre un valor de absorbancia de 2.00 y 2.02, el instrumento debe medir la diferencia entre 10 y 9.9 nA, o 0.1 nA. Para hacer esto exactamente, debe medir rangos dentro de 0.001 nA (1% de 0.1). Así, a altas absorbancias las limitaciones están causadas por la incapacidad del sistema detector de medir con exactitud pequeñas diferencias entre altos niveles de absorbancia.

Así, en análisis con niveles relativamente altos de compuesto absorbente o interferente habrá un error espectrofotométrico alto. Puede ser necesaria una dilución inicial para reducir la absorbancia total *además de* un blanco de muestra para eliminar este problema (para un ejemplo ver la discusión de turbidez en las páginas 427-428).

Espectrofotómetro de fluorescencia

Las medidas fluorescentes son diferentes de aquellas de espectrofotometría de transmisión en que la intensidad de la señal de fluorescencia está linealmente relacionada a la concentración. Cuando se duplica la señal de fluorescencia significa que la concentración aumento dos veces. Esto es verdad solamente si hay muy poca luz absorbida por la muestra. Si una porción significativa de la luz que atraviesa una muestra fluorescente es absorbida, la relación ya no es lineal: se vuelve una función matemática más compleja. Por lo tanto, para minimizar el error, un análisis de fluorescencia debe desarrollarse en soluciones diluidas, cuya absorbancia es menor de 0.1.

La dispersión de luz o la presencia de luz errática tiene efectos pronunciados sobre las mediciones de fluorescencia. Si la muestra dispersa la luz, parte de ésta puede ser observada por el detector como fluorescencia. Similarmente, si hay luz errática (un término que significa que la luz usada para excitar la muestra no era pura, o sea, no es una banda de color muy

estrecha), esto también puede ser registrado por el detector. Ya que solamente una pequeña fracción de la luz incidente (menos de 1% y a menudo menos de una parte en un millón de la entrada total de luz al instrumento) es detectada como fluorescencia, estas señales extrañas tienen un efecto desproporcionado sobre la lectura y consecuentemente sobre el error.

Las medidas de fluorescencia, al igual que las medidas de absorción, pueden ser inexactas o no válidas a causa de señales altas. A diferencia de la espectrofotometría de absorción, esto comúnmente ocurre a causa del sistema de elaboración de blancos. Si el fluorómetro es ajustado para leer cero con el blanco, la sensibilidad entera del detector se ajusta para esta lectura de cero. Suponga que hay una solución blanco que el instrumento registra como 10 unidades en su escala más sensible. El instrumento está ahora fijado para leer cero unidades de fluorescencia. Si el instrumento puede registrar exactamente este valor cero con una aproximación de ± 1 unidad, y si puede medir también una escala completa de 100 unidades del mismo modo, entonces puede medir con exactitud una señal de 100 ± 1 unidad. Si se usa una solución blanco diferente y esta es registrada como 100 unidades, este valor puede ser fijado a cero por el uso de manipulación electrónica (substracción de la señal). En esta nueva desviación de la escala completa de 100, el detector está realmente registrando 200, de los cuales 100 son restados como el blanco. Como el instrumento es exacto hasta 1%, ahora es exacto hasta el 1% de la nueva escala completa de 200 unidades. La exactitud de la medición es ahora ± 2 unidades. La exactitud es por lo tanto dos veces más pobre que la del primer ejemplo. Similarmente, si un blanco registra como 1000, la exactitud es de hasta un décimo. Por lo tanto el blanco limita la exactitud de las mediciones de fluorescencia.

Esta misma línea de argumentos también se aplica a otras medidas lineales como en el análisis electroquímico. El fondo puede ser manipulado como un blanco, pero esto debe ser considerado con relación a la señal total.

Interferencias in Vitro

Las interferencias in vitro surgen del hecho de que los análisis bioquímicos se desarrollan en las complejas matrices que forman los fluidos biológicos (suero, plasma, orina, líquido cefalorraquídeo, y otros). Estos fluidos contienen cientos de compuestos que conteniendo grupos químicos que pueden reaccionar en algún grado con los reactivos de prueba o pueden imitar las propiedades físicas, cromatográficas, o espectrales del compuesto de interés. Esta situación es más complicada debido a que la composición química de los fluidos del cuerpo pueden variar con la naturaleza y la magnitud del estado de enfermedad. Esta variabilidad está aumentada por la posible presencia de un gran número de fármacos. Cada uno de estos factores, solos o combinados, puede provocar una posible interferencia.

Las interferencias in vitro pueden ser subclasificadas en aquellas de naturaleza espectral y aquellas provocadas por reacciones químicas competitivas. Las interferencias más comúnmente observadas son hemólisis, ictericia, y lipemia. Desde un cuarto a un tercio de las muestras obtenidas de pacientes de clínica^{ref(463)} u hospitalizados^{ref(464)} son lipémicas, ictericas, o hemolisadas. Está disponible un compendio que enumera el grado de interferencia por hemólisis, ictericia, y lipemia en el análisis de 21 compuestos en 22 diferentes instrumentos.^{ref(465)}



Interferencias espectrales

Absorbancia.

Las interferencias espectrales se observan cuando un compuesto genera una respuesta en el espectrofotómetro similar a la del compuesto de interés, aunque los interferentes por sí mismos no necesariamente experimentan ningún cambio químico durante la reacción analítica. El ejemplo más simple y común es el efecto de la hemoglobina (Hb) sobre la mayoría de los procedimientos analíticos. Un espectro parcial de la HbO₂ (Fig. 23-3) muestra una absorción importante en la región entre 500 y 600 nm del espectro visible. Si uno estuviera monitoreando la reacción de un procedimiento colorimétrico en esta región del espectro visible, habría una importante interferencia positiva cuando la Hb esté contaminando la muestra. Otras moléculas, como la bilirrubina, ocasionan una interferencia similar.

Un ejemplo de la interferencia de Hb puede verse cuando se determina una concentración de proteínas totales (TP) séricas mediante monitoreo de la reacción de Biuret a 540 nm. La Fig. 23-4 muestra una curva estándar para esta reacción. Si se agrega a la muestra una concentración importante de hemoglobina, se aumenta la absorción a 540 nm, dando una lectura de proteínas totales erróneamente alta. En este ejemplo, la A₅₄₀ de un estándar de 50g/L es de 0.550. Si se agregan pequeñas cantidades de hemoglobina al estándar, la A₅₄₀ es de 0.650. Cuando esta solución es leída a partir de la curva del estándar, se calcula una concentración aparentemente más alta de proteína (línea punteada). La mayoría de las interferencias espectrales dan de esta manera resultados falsamente elevados.

Turbidez.

Un tipo común de interferencia espectral es provocada por la turbidez de la muestra. La turbidez es causada por grandes moléculas de lipoproteínas llamadas lipoproteínas de muy baja densidad (LMBD), las cuales están suspendidas en el suero. Cuando una muestra turbia es analizada en una reacción colorimétrica, las lipoproteínas provocan que luz incidente se disperse, en gran parte como ocurre en la nefelometría (ver Capítulo 4).

Como el análisis espectrofotométrico normalmente mide la luz transmitida a 180 grados respecto a la luz incidente, cualquier dispersión de luz tiende a disminuir la luz transmitida y por lo tanto a aumentar la absorbancia aparente de la muestra. Esto, por supuesto, provoca resultados falsamente elevados. Los blancos de muestra normalmente funcionan pobremente aquí, al igual que el análisis cinético de dos puntos (ver más adelante), debido al error que resulta de las absorbancias muy altas encontradas frecuentemente. El mejor método para eliminar la interferencia causada por la turbidez es la dilución de la muestra. El grado en que la muestra puede ser diluida para minimizar la interferencia turbidimétrica está limitado por la capacidad del procedimiento analítico para medir el compuesto de interés diluido. Si es posible, se deben analizar simultáneamente varias diluciones para determinar la mejor respuesta. Un ejemplo del efecto y eliminación de la interferencia por turbidez se presenta en el análisis de cantidades iguales de la actividad lactato deshidrogenasa (LD) en una muestra turbia y una no turbia (Tabla 23-2). Cuando se diluye la muestra no turbia, toda las actividades corregidas de LD caen en el mismo valor aproximado. Esto indica linealidad de la dilución. Por el contrario, cuando la muestra turbia se diluye, la actividad de la LD calculada cambia con la dilución. Solamente en altas diluciones conteniendo mínima turbidez la actividad de la LD calculada converge con los valores



verdaderos de la muestra no turbia.

Fluorescencia.

La turbidez afecta las medidas de fluorescencia de un modo similar. En este caso, algo de la luz dispersada podría alcanzar al detector ajustado a 90 grados respecto a la luz incidente, dando así un aumento aparente en la fluorescencia y por lo tanto concentraciones falsamente elevadas. Es más difícil reducir los problemas de turbidez en las mediciones de fluorescencia que en la espectroscopía de absorción. El mejor método es la eliminación de la fuente de dispersión de la luz por filtración o centrifugación.

Corrección de las interferencias espectrales

Blanco de muestra.

Las interferencias espectrales se pueden minimizar midiendo la absorbancia de la muestra que se está analizando contra una muestra blanco. El blanco de muestra más simple se obtiene mezclando la muestra y el diluyente (menos el reactivo). La corrección de la interferencia espectral es realizada restando el valor de absorbancia del blanco al de la absorbancia de la mezcla completa de reacción. Cualquier color importante inherente a la muestra es eliminado con este cálculo. En el ejemplo de la reacción de biuret discutido previamente, la absorbancia de la muestra y de la hemoglobina diluida con solución salina es 0.100. Si esto se resta a la absorbancia de la mezcla de reacción completa (0.650), se obtiene la absorbancia verdadera del estándar (0.550). Este blanco de muestra puede funcionar normalmente a menos que estén presentes grandes cantidades de un interferente. En estos casos, una absorción total muy grande ($A_{\text{interferente}} + A_{\text{reacción}}$) provoca grandes errores de espectrofotométricos y errores de cálculo. Los análisis de acceso aleatorio (ver capítulo 16) permiten fácilmente la medición de la absorbancia del blanco de muestra antes de la adición del reactivo.

Los blancos de reactivo (reactivo más diluyente) son usados de una forma similar para corregir las altas absorbancias de los reactivos.

En el caso de fluorescencia, el blanco de muestra permite la corrección de la fluorescencia no específica; sin embargo, la fluorescencia de este blanco no puede constituir una porción grande de la señal total de fluorescencia (ver texto anterior).

Medidas cinéticas.

Un método frecuentemente usado para la corrección de la interferencia espectral es la medición de una típica *reacción de punto final*, como lo es la reacción cinética de dos puntos. Si se monitorea la absorbancia de una reacción colorimétrica no instantánea en función del tiempo, se observa una curva de reacción como la mostrada en la Fig. 23-5. Una reacción de punto final se monitorea a un solo punto de tiempo, cuando la reacción casi se ha completado (Fig. 23-5, flecha 3). Si no hay interferencias espectrales, la curva de reacción debería pasar por el origen. Si existe este tipo de interferencia, la curva será *paralela* a la original pero sesgada hacia valores más elevados debido al color endógeno de la muestra. Si se usa un blanco de muestra para restar el color endógeno, se obtendrá una línea idéntica a la de la muestra que no contiene interferencias.

En un ensayo cinético de dos puntos, la absorbancia es medida a dos puntos diferentes

de tiempo (Fig. 23-5, flechas 1 & 2); cuando (1) el desarrollo final de color no ha ocurrido y de hecho puede ser pequeño y, (2) cuando la respuesta de absorbancia versus tiempo es todavía lineal.

La lectura inicial (Fig. 23-5, flecha 1) se toma realmente cuando casi no ha ocurrido formación de color. De esta manera, cualquier absorbancia a este tiempo es principalmente ocasionada por interferentes espectrales endógenos. Una segunda lectura se toma a un tiempo corto después cuando se ha formado solamente una pequeña cantidad de color y la respuesta de absorbancia versus tiempo es todavía lineal (Fig. 23-5, flecha 2). Esta absorbancia por lo tanto incluye la del color endógeno original y la del color producido debido a la reacción analítica específica. Al substrair la primera lectura de la segunda, la *delta de absorbancia* calculada (DA) es causada solamente por el color específico formado por la reacción analítica. En las curvas estándar basadas en los análisis cinéticos se grafica el cambio en la absorbancia (DA) versus la concentración (Fig. 23-6). En esta curva estándar la presencia de un interferente coloreado, no reactivo, endógeno, no tiene efecto. Por consiguiente no se necesita hacer una medición separada de blanco de muestra; una reacción cinética de dos puntos es por sí misma un blanco cuando no hay cambio en la naturaleza del interferente durante la reacción. Esta es una técnica importante cuando se están desarrollando análisis químicos automatizados en un gran número de muestras.

Análisis bicromático.⁴

Muchos instrumentos de uso corriente emplean diferentes técnicas para la corrección de interferencias espectrales. Esta técnica involucra la medición de la absorbancia de una mezcla de reacción a dos longitudes de onda diferentes simultáneamente. Estas son la longitud de onda principal (λ_1) y otra longitud de onda cercana (λ_2). Como muestra la Fig. 23-7, λ_1 es la longitud de onda a la cual el cromógeno tiene la máxima absorción. En λ_2 hay un mínimo de absorción del cromógeno. Como la reacción es monitoreada simultáneamente a dos longitudes de onda, esta es conocida como análisis bicromático. Esta técnica está basada en la premisa que aunque un compuesto puede dar una interferencia espectral, la absorbancia máxima del interferente será diferente de la de la reacción analítica verdadera. Además, este procedimiento se realiza bajo la presunción que la absorción causada por el compuesto interferente es aproximadamente la misma en λ_1 que en λ_2 . Aunque la absorbancia medida a λ_1 será producida por ambas, la reacción analítica y el interferente, la absorbancia a la segunda longitud de onda (λ_2) será causada solamente por el interferente. Esta técnica puede corregir también los problemas de instrumento como la suciedad en la celda o cubeta, lo cual provoca dispersión o reflexión de la luz. Las curvas estándar se basan entonces y sea en la substracción $A_1 - A_2$ ó en el cociente de las dos absorbancias (A_1/A_2). El uso de este procedimiento permite también que cada muestra sea utilizada como su propio blanco para el color endógeno.

Otro método similar para la corrección de la interferencia de fondo es la medición de la absorbancia a la longitud de onda primaria A_{\max} y a dos longitudes de onda adicionales, generalmente equidistantes del pico, A_1 y A_2 . Las lecturas de absorbancia a estas dos últimas longitudes de onda son promediadas para dar la absorbancia de fondo promedio en la muestra. Esta técnica para la corrección de la absorbancia de fondo de las sustancias interferentes es conocida como la *corrección de Allen*.^{ref(466)}



La corrección de Allen es válida solamente si la absorbancia de fondo es aproximadamente lineal con una longitud de onda en la región en la cual son realizadas las mediciones. Así, debe obtenerse la forma de la curva de absorción tanto para el compuesto analizado más el interferente (línea sólida) como para el interferente o interferentes (línea punteada), como la mostrada en la Fig. 23-8. El uso de la corrección de Allen en este ejemplo, esto es, cuando las longitudes de onda usadas para corregir el fondo son equidistantes de la absorbancia máxima, daría la siguiente ecuación:

$$A_{300} \text{ corregida} = A_{300} - \frac{A_{320} + A_{280}}{2} \quad \text{Ec. 23-1}$$

La “ A_{300} corregida” tiene restada de la absorbancia máxima la absorbancia de fondo promedio para dar la absorbancia real por encima del valor basal. La corrección de Allen es ampliamente usada, pero su uso inapropiado, es decir, con interferencia de fondo no lineal, puede conducir a errores aún más grandes. Como la absorbancia corregida final está basada en tres medidas, hay una disminución en la precisión del ensayo.

Dilución.

Como se discutió en el caso de la turbidez, la dilución de una muestra que contiene interferentes espectrales puede algunas veces reducir el problema. Se debe ser cuidadoso en no diluir en exceso el compuesto deseado o el cromógeno a una concentración por debajo del nivel mínimo detectable para ese ensayo. Muchas diluciones deben ser analizadas simultáneamente para determinar la dilución más efectiva.

Interferencias químicas

Todas las interferencias que se discutieron hasta ahora han sido interferencias espectrales causadas por compuestos que no participan en la reacción química analítica. Sin embargo, muchas interferencias reaccionan con las sustancias analizadas. Los productos de reacción de estas interferencias generalmente provocan interferencias positivas, aunque se han observado interferencias negativas.

Los tipos de interferentes reactivos químicamente, no específicos pueden variar ampliamente, como se ve en el ejemplo en la Tabla 23-3. El ácido úrico produce una interferencia positiva, y la bilirrubina y el ácido ascórbico producen interferencias negativas en los métodos de glucosa oxidasa usados para medir la glucosa. La reacción de picrato alcalino para la medición de creatinina presentan ambas interferencias positivas (cetonas, proteínas) y negativas (bilirrubina).

Corrección de las interferencias químicas

La eliminación de muchos de los interferentes químicos no específicos se logra a menudo por medio de una o más de las siguientes técnicas:

1. Diluyendo el interferente.
2. Aumentando la especificidad de la reacción.
3. Removiendo el interferente.

4. Monitoreando un ensayo por medición cinética.
5. Monitoreando un ensayo por medición bicromática.

La dilución de la muestra es un método efectivo en los casos de los interferentes que no reaccionan a la misma velocidad o producen la misma intensidad de color que el compuesto analizado. La interferencia por proteínas se minimiza en muchos analizadores automatizados por una dilución grande de la muestra.

El aumento de especificidad de una reacción analítica es a menudo lograda por el uso de enzimas específicas como reactivos. Los ejemplos de este método incluyen la medida de glucosa por hexocinasa o glucosa oxidasa, ácido úrico por uricasa, y urea por ureasa. Las reacciones con base inmunoquímica son también usadas para aumentar la especificidad del análisis. Un ejemplo sería la medida de teofilina por inmunoensayo enzimático comparado con otros métodos, los cuales emplean absorbancia ultravioleta.

La separación de un interferente del compuesto analizado puede lograrse por el uso de: (1) una muestra libre de proteínas, (2) extracción líquido-líquido, o (3) cromatografía de adsorción o partición. Las muestras libres de proteínas fueron originalmente preparadas por precipitación de las proteínas del suero y separación de la muestra libre de proteínas por filtración o centrifugación. Los agentes usados para precipitar las proteínas incluyen ácido túngstico (procedimiento de Folin-Wu) y sales de metales pesados (como bario y zinc; procedimiento de Somogyi-Nelson). Las muestras libres de proteínas obtenidas por técnicas de diálisis fueron la base de muchos procedimientos de los autoanalizadores Technicon.

Las extracciones líquido-líquido se usan cuando el compuesto analizado y el interferente o los interferentes pueden ser separados en fases líquidas diferentes. Similarmente, en la cromatografía de adsorción y partición, el compuesto analizado y el interferente son separados por sus diferencias de afinidades por la fase estacionaria (ver Capítulos 5 al 7).

El principio para la eliminación de los reactantes químicos no específicos por el uso de una reacción cinética de dos puntos es el hecho de que muchos interferentes reaccionan a una *velocidad* diferente de la que reacciona el compuesto específico de interés. Esto se observa en el ejemplo de la reacción de Jaffé con creatinina.[ref\(467\)](#)

La creatinina reacciona con el picrato alcalino a una velocidad finita (curva de CV creatinina verdadera) (Fig. 23-9). Muchos de los interferentes no específicos (como la acetona) reaccionan a una velocidad cinética mayor (VA), mientras que algunos (como las proteínas) reaccionan a una velocidad menor (VB), dando un complejo cambio de absorbancia con el tiempo para la reacción de una mezcla de las tres especies (Fig. 23-10). Por lo tanto, la elección adecuada de una ventana óptima de tiempo para las dos lecturas de absorbancia que requiere el análisis cinético (flechas Fig. 23-9, puede minimizar el efecto de los interferentes no específicos que reaccionan más rápido o más lento y aislar el cambio de absorbancia causado principalmente por la creatinina. Durante la ventana óptima de tiempo, la reacción de los interferentes a VA es esencialmente completa, mientras que la de los interferentes a VB no ha ocurrido aún (Fig. 23-10). El ΔA durante este tiempo está causado por el compuesto analizado, que es la creatinina. Este concepto ha sido usado también para la reacción de glucosa oxidasa y es, de hecho, una técnica popular para aumentar la especificidad de las reacciones en muchos instrumentos.



Interferencias cromatográficas

El tercer tipo de interferencia común in vitro, o metodológica es la interferencia cromatográfica. Ésta frecuentemente ocurre cuando un compuesto interferente es sujeto a cromatografía junto con el compuesto de interés, dando resultados falsamente elevados.

Actualmente, muchos procedimientos analíticos usan cromatografía para separar el compuesto a ser medido de los compuestos interferentes. Un método cromatográfico es hecho bajo la suposición de que el compuesto deseado se puede aislar completamente de otros compuestos que puedan ser registrados por el sistema de detección. Sin embargo, no existe un solo conjunto de condiciones cromatográficas capaces de evitar las interferencias de compuestos cuyas propiedades cromatográficas son similares o cercanas a las del compuesto que se desea aislar, especialmente cuando el paciente puede estar recibiendo varias drogas potencialmente interferentes.

Un ejemplo de este tipo de interferencia y su corrección se puede ver en la separación por cromatografía líquida de alta eficacia (más conocida bajo su abreviatura inglesa HPLC por "high performance liquid chromatography") de catecolaminas y el fármaco metildopa (Aldomet), que se usa en el tratamiento de la hipertensión. En algunos ensayos de HPLC, la metildopa es eluída de la columna justo antes de la norepinefrina. Como la dosis farmacológica del Aldomet es mucho mayor que las concentraciones fisiológicas de norepinefrina, el fármaco puede enmascarar al pico de norepinefrina o ser confundido él. El único camino para eliminar este tipo de interferencia es remover la fuente de interferente exógeno. En el caso de la metildopa, se requiere quitar la droga al paciente por 2 a 10 días. Las restricciones de drogas o dieta antes de un análisis bioquímico son frecuentemente una necesidad para muchos compuestos.

Hay dos modos principales para minimizar los interferentes cromatográficos: (1) aumentar la especificidad del detector y (2) remover el interferente del compuesto analizado. Los detectores pueden medir los compuestos basados en una variedad de principios diferentes. Si el interferente tiene propiedades físicas o químicas diferentes a las del compuesto a medir, es posible seleccionar un detector que no responda significativamente a un interferente potencial. En la cromatografía de líquidos, los detectores del índice de refracción pueden detectar casi cualquier compuesto en el eluyente; como consecuencia, esta instrumentación es muy inespecífica. Los detectores de fluorescencia tienen especificidades más altas porque no todos los compuestos fluorescen. Mediante la elección de una apropiada excitación y emisión de longitudes de onda, el detector puede hacerse aún más específico. Los detectores electroquímicos también tienen alta especificidad porque no todos los compuestos son eléctricamente activos. La especificidad puede ser aumentada por selección de un electrodo de voltaje que no reacciona con el interferente.

Como se discutió previamente, la separación de los compuestos de interés de los potenciales compuestos interferentes se alcanza por varias técnicas. Estas técnicas están basadas en las diferencias en solubilidad o comportamiento cromatográfico entre el compuesto analizado y los interferentes. Las técnicas comúnmente usadas son extracciones simples líquido-líquido, extracciones múltiples incluyendo extracciones del fondo, y cromatografía de adsorción y de intercambio iónico. La complejidad de procedimiento usado depende de la naturaleza de la interferencia y de la sensibilidad requerida. Los métodos de HPLC para teofilina sérica, presentes en cantidades relativamente grandes, comúnmente emplean solo una extracción simple líquido-líquido. En contraste, los análisis de HPLC de los antidepresivos



tricíclicos presentes en cantidades de nanogramos requieren varios pasos de extracción, incluyendo extracciones de fondo. En el Capítulo 5 se discuten estos tipos de procedimientos con más detalles.

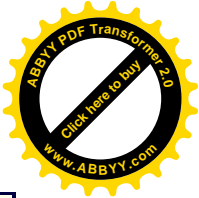
Una técnica para detectar compuestos contaminantes o con propiedades cromatográficas similares a las del compuesto de interés es el análisis de detección dual. Esta técnica usa dos tipos diferentes de detectores o parámetros, como múltiples longitudes de onda, para monitorear el eluido de la columna. La respuesta de los dos detectores (D_1 y D_2) se determina por un estándar, y la relación de las respuestas se calcula (D_1 estándar/ D_2 estándar). La probabilidad de que otro compuesto tenga una relación característica similar es bastante pequeña. Así, desviaciones importantes de la relación encontrada en los análisis del paciente serán fuertemente sugestivas de que el pico del compuesto analizado contiene un contaminante, esto es, un compuesto que eluye junto con éste.

Frecuentemente se reconoce también la presencia de un interferente por la forma anormal del pico cromatográfico. La presencia de un contaminante a menudo provoca un sesgo en un pico normalmente simétrico. En estos casos, volver a correr el cromatograma a velocidades de flujo menores puede algunas veces separar o parcialmente separar el analito del compuesto interferente, permitiendo la cuantificación.

Interferencias inmunoquímicas

Los métodos inmunoquímicos están sujetos a las causas usuales de interferencia exógena (ver cuadro más adelante). [ref\(468\)](#) Además, sin embargo, ellos están sujetos a los efectos de matriz de la solución de reacción y en algunos casos, de la superficie donde ocurre la reacción. La hiperlipidemia puede afectar mucho las reacciones inmunoquímicas que usan medidas turbidimétricas o nefelométricas debido a la aumentada turbidez de la muestra. La interferencia más difícil de detectar es aquella en la cual el paciente tiene anticuerpos contra los anticuerpos del reactivo de prueba (anticuerpos heterófilos), o contra el antígeno de prueba verdadero. Los anticuerpos heterófilos más frecuentemente encontrados, aquellos contra los anticuerpos de ratón (AHARs), pueden causar interferencia en los ensayos que emplean anticuerpos monoclonales de ratón. Los métodos para reducir estas interferencias incluyen la adición de suero animal específico, como suero de ratón, al reactivo de la prueba para combinarse con los anticuerpos heterófilos y neutralizarlos. Frecuentemente la única indicación de que el paciente tiene anticuerpos contra el compuesto de interés de prueba es la historia del paciente, la cual puede indicar que los resultados de las pruebas no son consistentes con los hallazgos clínicos. Un ejemplo interesante del problema de los anticuerpos endógenos se puede ver en la medición de digoxina. En sobredosis agudas de digoxina, el paciente puede ser tratado con Digabind, un fragmento Fc de los anticuerpos de IgG contra digoxina que se une a ésta, minimiza la toxicidad, y aumenta la depuración. El Digabind también reacciona con digoxina marcada en un inmunoensayo y aparentemente causa niveles de digoxina muy elevados.

Para los inmunoensayos enzimáticos, algunas de las interferencias son las mismas que las observadas en los ensayos enzimáticos ordinarios, como se muestra en el cuadro siguiente.



Interferencias Comunes en Inmunoensayos*

Interferencia exógena

Recolección y preparación de la muestra, incluyendo anticoagulantes, almacenamiento de la muestra, fármacos, y geles separadores de suero.

Matriz de calibración

Cambios en la superficie de unión de la fase sólida ocasionada por moléculas de recubrimiento

Saturación incompleta de los sitios de unión de la fase sólida por el antígeno o anticuerpo

Interferencia endógena

Hiperlipidemia – turbidez

Anticuerpos antiinmunoglobulina heterófilos (AHARs).

Anticuerpos iatrogénicos, como el Digabind (ver p. 433).

Factor reumatoideo

Autoanticuerpos contra el compuesto analizado.

Complemento

Sustancia que produce reacción cruzada, como el FIPD.

Anticuerpos inmunoespecíficos que compiten con el compuesto analizado.

FIPD, factor inmunoreactivo que une Digoxina; AHARs, anticuerpos antiratón humanos.

*Modificado de Pesce AJ, Micheal JG: J Immunol Methods 150:111-119, 1992.

Interferencia para los Inmunoensayos Enzimáticos *

Interferencia exógena

Inhibidor de enzima

Interferencia endógena

Enzima endógena

Sustrato endógeno

Espectral: lípidos, hemoglobina

Fármacos que inhiben la actividad enzimática

Medición de la actividad enzimática

Temperatura

Reacción del sustrato con la fase sólida

Cinéticas no lineal

Sensibilidad limitada

Agotamiento del sustrato

*Modificado de Pesce AJ, Micheal JG: J Immunol Methods 150:111-119, 1992.

Interferencias in Vitro

Los factores como la edad y sexo, hora del día, dieta, embarazo y menstruación, así



como también errores en el procesamiento de la muestra pueden afectar el resultado de una prueba. Estos se discuten en el Capítulo 3. La presencia de agentes farmacológicos en el paciente es una fuente común de interferencia.

Fármacos

Virtualmente cada fármaco afecta algún procedimiento de laboratorio, y cualquier procedimiento de laboratorio puede ser afectado por una o más drogas. La interferencia puede ser *in vivo* o *in vitro*. Un ejemplo de una droga comúnmente encontrada es el alcohol, cuya ingestión puede afectar los niveles de glucosa, lactato, ureato, bicarbonato, γ -glutamiltransferasa, y creatinina fosfocinasa.[ref\(469\)](#) El tabaquismo puede alterar los resultados de catecolaminas, cortisol, y gases sanguíneos. Es necesario hacer referencia al material de las fuentes interferentes a fin de determinar el efecto de cualquiera del enorme número de fármacos sobre una prueba específica.

Material de Referencia Sobre las Fuentes Interferentes

Este capítulo provee solo una breve descripción de la amplia variedad y tipos de interferencias en las pruebas del laboratorio químico. Muchas sustancias interferentes comunes están bien documentadas, y un personal de laboratorio vigilante puede eliminar frecuentemente éstas como una fuente de interferencia. Por ejemplo, el desarrollo de un interferograma[ref\(470\)](#) permite al laboratorio estimar el efecto de la hemólisis, ictericia, y lipemia sobre los análisis realizados en instrumentos usados frecuentemente. Los más recientes analizadores químicos automatizado puede calibrarse para detectar niveles aumentados de hemólisis, lipemia e ictericia.

Sin embargo, como el número de medicamentos producidos por las compañías farmacéuticas y consumidas por el público aumenta, el laboratorio debe determinar los efectos *in vivo* e *in vitro* ejercidos por cada una de estas drogas sobre el análisis clínico de laboratorio.

Una lista de los efectos conocidos de las drogas y otras interferencias sobre el análisis químico fue desarrollada por Donald Young y publicado como un fascículo de *Clinical Chemistry* en Abril de 1975[ref\(471\)](#) y publicado en una tercera edición en 1990 con un suplemento en 1991.[refs\(472\)](#) Aunque fue anticuado cuando se publicó, sigue siendo el mejor y único listado de efectos de las drogas sobre pruebas de laboratorio. En una de las dos secciones principales están enumerados en orden alfabético los posibles interferentes (no solamente drogas). Enumerado bajo cada interferente están las pruebas de laboratorio que pueden ser afectadas por dicho agente.

Una sección del estudio de Young se muestra en la Fig. 23-11. Los barbitúricos son los interferentes probados. La letra mayúscula inicial indica el tipo de fluido corporal en que se analizó la prueba de laboratorio (U = orina, S = suero, etc.); luego se presentan las pruebas de laboratorio en orden alfabético. Después de cada prueba está la indicación de cómo el interferente probado afecta la prueba de laboratorio (inc = incrementa, dis = disminuye, y c = no hay efecto). La siguiente letra mayúscula indica el tipo de interferencia (V = *in vivo*; M = metodológica). Un comentario y una referencia completan el listado de pruebas.

La sección que enumera los interferentes está indexada de manera cruzada con otra



sección que enumera, en orden alfabético, las pruebas de laboratorio. Cada prueba de laboratorio está enumerada por subsecciones de acuerdo a disminuido (dis), aumentado (inc), o no-efecto (c) de los interferentes enumerados para esa prueba. La prueba de laboratorio también está enumerada como compuesto analizado urinario (U) o sérico (S). Bajo cada prueba de laboratorio está enumerado el interferente para el cual se ha mostrado el efecto (inc, dis, o c).

La complejidad y la extensión del trabajo de Young destacan el conocimiento que el personal de laboratorio debe tener en lo que concierne a interferencias con las pruebas clínicas de laboratorio. Una edición complementaria al listado de 1975 fue publicada en 1980^{ref(473)} y actualizada en 1989.^{ref(474)} Este volumen enumera los efectos de la enfermedad sobre las pruebas del laboratorio clínico. El formato de este volumen es similar al ya descrito. La primera sección enumera cada compuesto analizado y aquellos estados de enfermedad en los que se han notado cambios en su concentración. La segunda sección enumera las enfermedades y aquellos compuestos analizados que cambian durante el curso de la enfermedad.

Evaluación de la interferencia analítica

Como virtualmente todos los procedimientos analíticos de química clínica pueden ser interferidos por los factores de variación preanalítica y la muestra del paciente por sí misma (ver Capítulo 3), se han propuesto muchos protocolos para evaluar la magnitud de la interferencia potencial.^{refs(475)}

Frecuentemente el muestreo de interferencia espectral involucra la adición de una sustancia lipídica Intralipid (Kabi Vitrum, Alameda, California), un hemolisado, o bilirrubina.^{ref(476)} En algunos casos el método de prueba se compara contra un método de referencia o definitivo que no está sujeto a la interferencia que está siendo evaluada. Estas técnicas incluyen espectroscopía de masas por dilución isotópica, activación de neutrones, absorción atómica, y otras técnicas especializadas. Una propuesta más extensa para las pruebas de interferencia puede encontrarse en la referencia 16.^{ref(477)}

Interferencia permisible

Debido a que alguna interferencia está potencialmente presente para cada ensayo, los químicos clínicos deben determinar cuanta interferencia es permisible. Un interferente estadísticamente importante puede no ser clínicamente significativo. Un enfoque es usar los límites de decisión médica.^{ref(478)} El concepto de errores clínicamente importantes se revisa en el Capítulo 21, y los ejemplos de su aplicación se encuentran en el Capítulo 22. El tamaño del error permisible se determina de la consulta con los clínicos que son los que usan los resultados de las pruebas y de las discusiones de error permisible disponibles en la literatura.

El error analítico total, E_A , de un método es la suma de sus imprecisiones, la cual es igual a la suma de dos veces la desviación estándar (2DE), su desviación analítica (E_B), y el error que resulta de los interferentes (E_I):

$$E_A = 2DE + E_B + E_I \quad \text{Ec. 23-2}$$



Para que cualquier ensayo sea clínicamente útil, el error analítico total, E_A , debe ser menor que el error total permisible a nivel de decisión médica, E_{MDL} , para cada compuesto analizado. Si el laboratorio conoce los errores $SD + E_B$ y puede estimar el E_{MDL} , entonces se puede calcular la contribución permisible por un interferente, E_I :

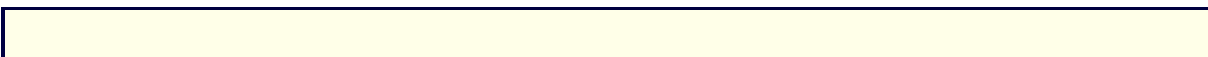
$$E_I = E_{MDL} - 2DE - E_B \quad \text{Ec. 23-3}$$

Esta discusión esta hecha bajo la suposición de que el error total permisible basado en las necesidades hechas sobre la decisión médica es mayor que el error total permisible permitido para los compuestos regulados por la CLIA' 88. Estos cálculos pueden ser usados para determinar los errores analíticos permisibles bajo estas regulaciones (ver Capítulo 21).

Así, para lograr ensayos precisos con pequeña desviaciones estándar y grandes cambios antes de alcanzar el valor de decisión médica, se pueden tolerar grandes errores provocados por interferentes. En contraste, algunas medidas, como la creatinina en los pacientes transplantados, tienen un error permisible pequeño (a menudo menor que 20%), que debe incluir el sesgo, la variabilidad del método, y la interferencia. Por consiguiente, en estos métodos hay menos tolerancia para la interferencia.

Referencias

1. Glick MR: Ohio Valley Section Meeting on "Interferences," Cincinnati, Ohio, Feb 27, 1988.
2. Kaplan LA: Ohio Valley Section Meeting on "Interferences," Cincinnati, Ohio, Feb 27, 1988.
3. Glick MR, Ryder KW: *Interferographs: user's guide to interferences in clinical chemistry instruments*, Indianapolis, 1987, Science Enterprises, Inc.
4. Hahn B, Vlastelica DL, Snyder LR, et al: Polychromatic analysis: new applications of an old technique, *Clin Chem* 25:951-959, 1979.
5. Allen E, Rieman W: Determining only one compound in a mixture, short spectrophotometric method, *Anal Chem* 25:1325-1331, 1953.
6. Soldin SJ, Henderson L, Hill JG: The effect of bilirubin and ketones on reaction rate methods for the measurement of creatinine, *Clin Biochem* 11:82-86, 1978.
7. Pesce AJ, Michael JG: Artifacts and limitations of enzyme immunoassay, *J Immunol Methods* 150:111-119, 1992.
8. Freer DE, Statland BE: The effect of ethanol (0.75 g/kg body weight) on the activities of selected enzymes in sera of healthy young adults. I. Intermediate-term effect, *Clin Chem* 23:830-834, 1977.
9. Young DS, Pestaner LC, Gibberman V: Effects of drugs on clinical laboratory tests, *Clin Chem* 21:1D-432D, 1975.
10. Young DS: *Effects of drugs on clinical laboratory tests*, ed 3, Washington, D.C., 1990, American Association for Clinical Chemistry.
11. Young DS: *1991 supplement to the effects of drugs on clinical laboratory tests*, Washington, D.C., 1991, American Association for Clinical Chemistry.
12. Friedman RB, Anderson RE, Entine SM, Hirshberg SB: Effect of diseases on clinical laboratory tests, *Clin Chem* 26:1D-476D, 1980.
13. Friedman KB, Young DS, Effect of diseases on clinical laboratory tests, ed 2, Washington, D.C., 1989, American Association for Clinical Chemistry.
14. Buttner R, Dorth R, Boutwell JH, et al: International Federation of Clinical Chemistry expert panel on 904



- nomenclature and principles of quality control in clinical chemistry. Approved recommendation (1978).
Part 2: Assessment of analytical methods for routine use, *Clin Chim Acta* 98:129F-143F, 1979.
15. Galteaux MM, Siest G: IFCC. Drug effects in clinical chemistry. Part 2: Guidelines for evaluation of an analytical interference, *J Clin Chem Clin Biochem* 22:275-279, 1984.
 16. *Interference testing in clinical chemistry; proposed guideline*, NCCLS Publication EP7-P, Villanova, Penn., 1986, National Committee on Clinical Laboratory Standards.
 17. Glick MR, Ryder KW, Jackson SA: Graphical comparison of interferences in clinical chemistry instrumentation, *Clin Chem* 32:470-475, 1986.
 18. Castano-Vidriales JL: Interferences in clinical chemistry, *J Int Fed Clin Chem* 6:7-9, 1994.

Tablas

Tabla 23-1. Error de la absorbancia en función del porcentaje de transmitancia.

% T y error	Absorbancia	Variación en absorbancia	% de error en la medida de A
4 ± 1	1.398	0.22	15.8
10 ± 1	1.000	0.041	8.60
25 ± 1	0.602	0.035	5.79
35 ± 1	0.456	0.025	5.44
50 ± 1	0.301	0.017	5.78
70 ± 1	0.155	0.012	8.03
90 ± 1	0.046	0.0097	21.2

Tabla 23-2. Efecto de la turbidez sobre la determinación de actividad de LD(U/L).

Dilución (salina)	Actividad de LD (U/L)			
	Muestra no turbia		Muestra turbia	
	No corregida	Corregida	No corregida	Corregida
No diluida	440	—	28	—
1:2	245	450	32	64
1:4	136	444	30	120
1:8	62	496	26	208
1:16	30	480	25	400
1:32	14	450	13	416



Tabla 23-3. Ejemplos de agentes bioquímicos interferentes.

Analito	Método	Interferencias
Glucosa	Azúcar reductor	Acido úrico (+), creatinina (+), proteína (+), glutatión(+)
	Glucosa oxidasa–peroxidasa de rábano	Acido úrico (+), ácido ascórbico (-), bilirrubina (-)
	Glucosa oxidasa–consumo de O ₂	Hemoglobina (-), ácido ascórbico (+).
	Hexocinasa	Fructuosa
Creatinina	Picrato alcalino	Acido ascórbico (+), glucosa (+), proteínas(+),cetona(+)
Acido vanillin	Pisano	Ciertos alimentos(como bananas), vainilla, aspirina (+)
mandélico	HPLC	Ciertas drogas y sus metabolitos (+)
+, interferencia positiva; -, interferencia negativa		

Figuras



Figura 23-1 Escalas superpuestas de Absorbancia y porcentaje de Transmitancia

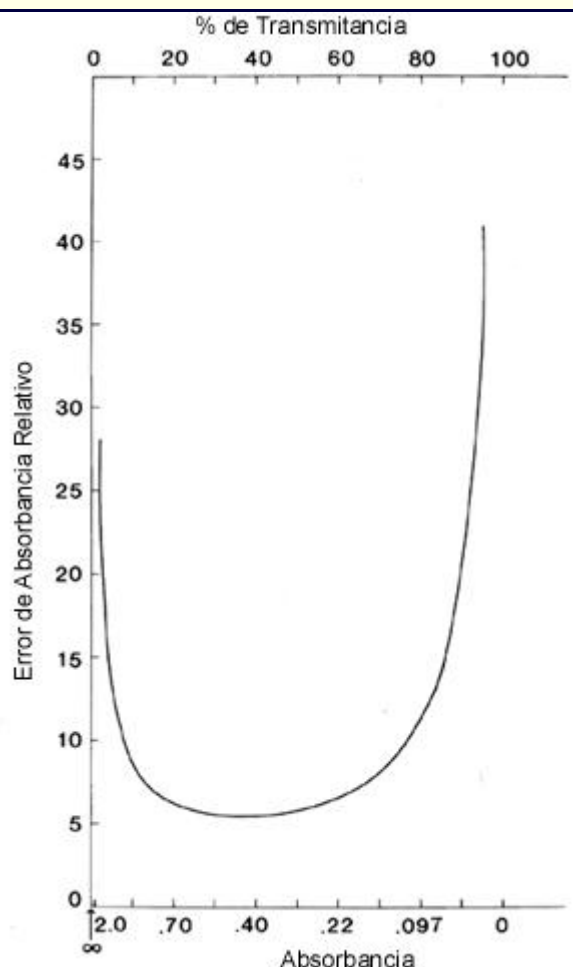


Figura 23-2 Error relativo de absorbancia versus absorbancia (A) y porcentaje de transmitancia (%T) para un error de $\pm 1\%$ en la medición de luz transmitida. El error relativo es mínimo a 36.8% de T y A es 0.434.

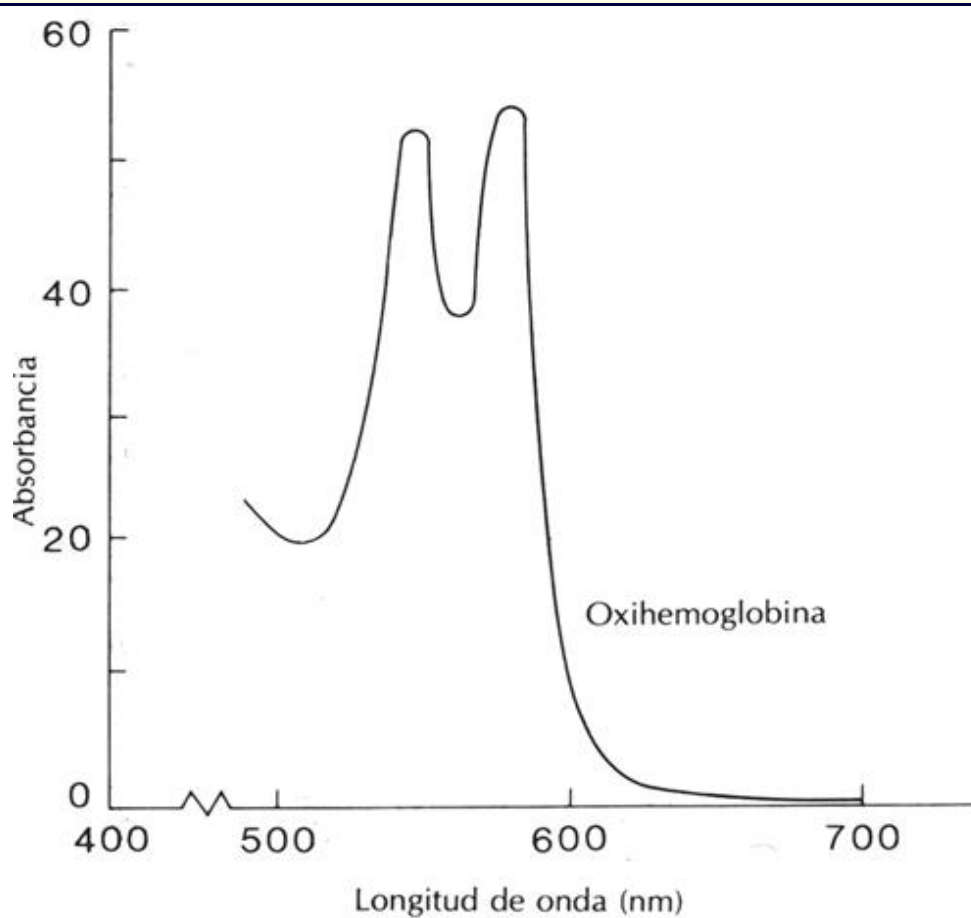


Figura 23-3 Espectro parcial de la oxihemoglobina (HbO₂)

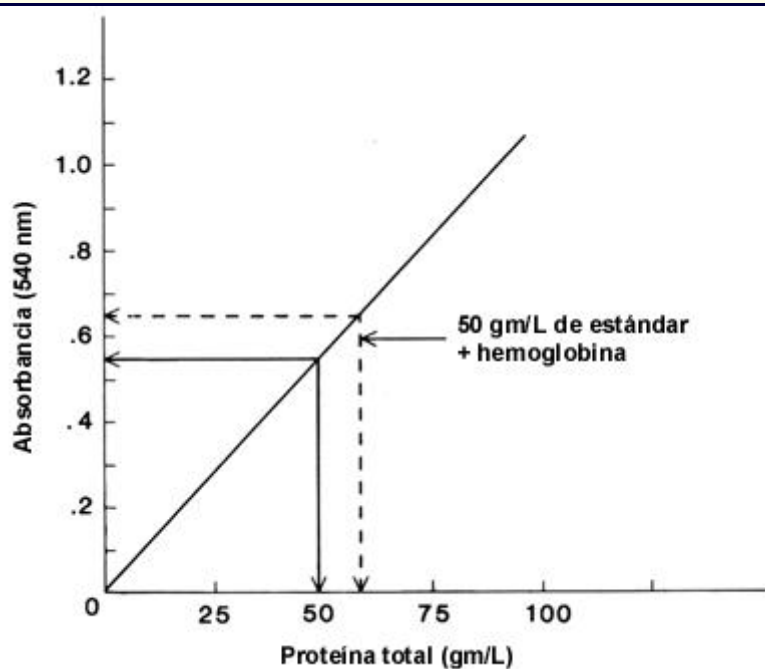


Figura 23-4 Curva estándar para la determinación de proteínas totales por la reacción de biuret : A_{540} versus concentraciones. *Flecha llena*, A_{540} para un estándar de 50g/L; *Flecha punteada*, A_{540} para el mismo estándar más hemoglobina.

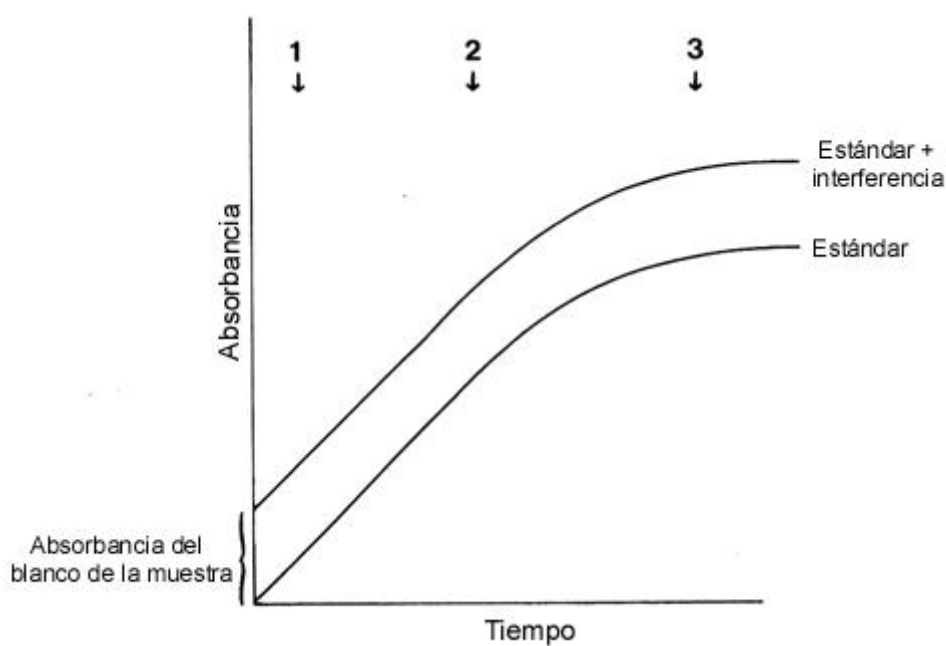


Figura 23-5 Cambios de absorbancia en función del tiempo para una reacción

colorimétrica con la presencia de un interferente o sin ella. *Flechas 1 y 2*, tiempo definido para el análisis cinético; *flecha 3*, lectura de punto final.

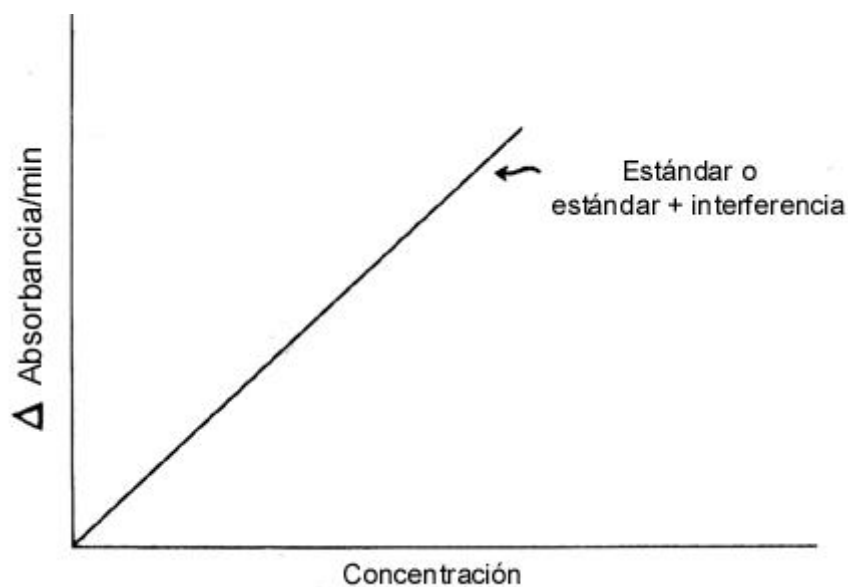


Figura. 23-6 Análisis cinético de las dos reacciones de la Fig. 23-5. Cambio de absorbancia (ΔA) por minuto versus concentración en la porción lineal de la curva de absorbancia obtenida entre las flechas 1 y 2 en la Fig. 23-5.

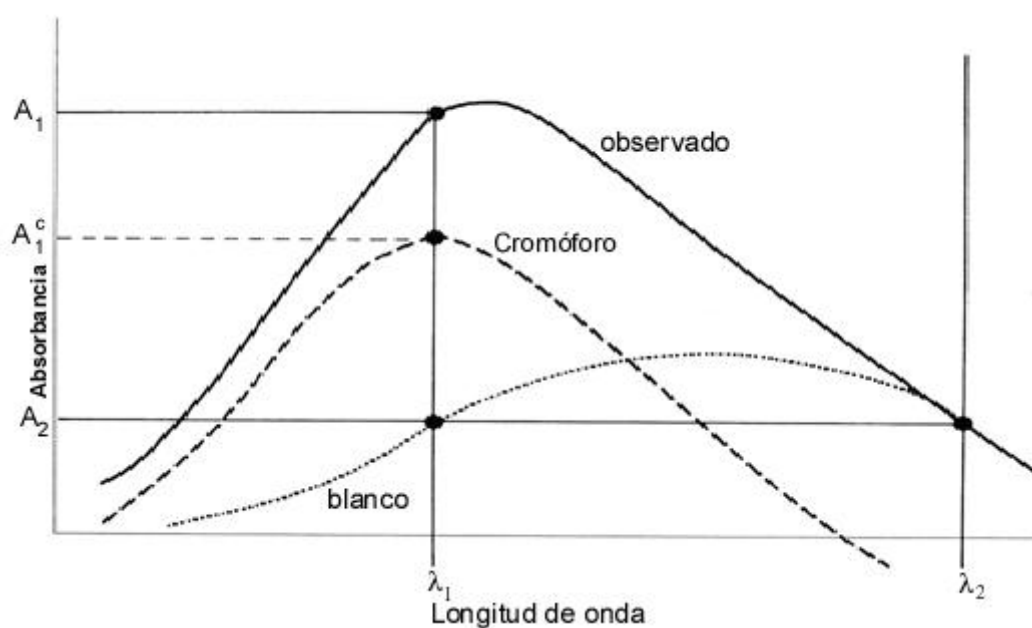


Figura 23-7 Curvas espectrales para un cromóforo y un blanco no reactivo, donde la absorbancia del blanco es igual en λ_1 y λ_2 .

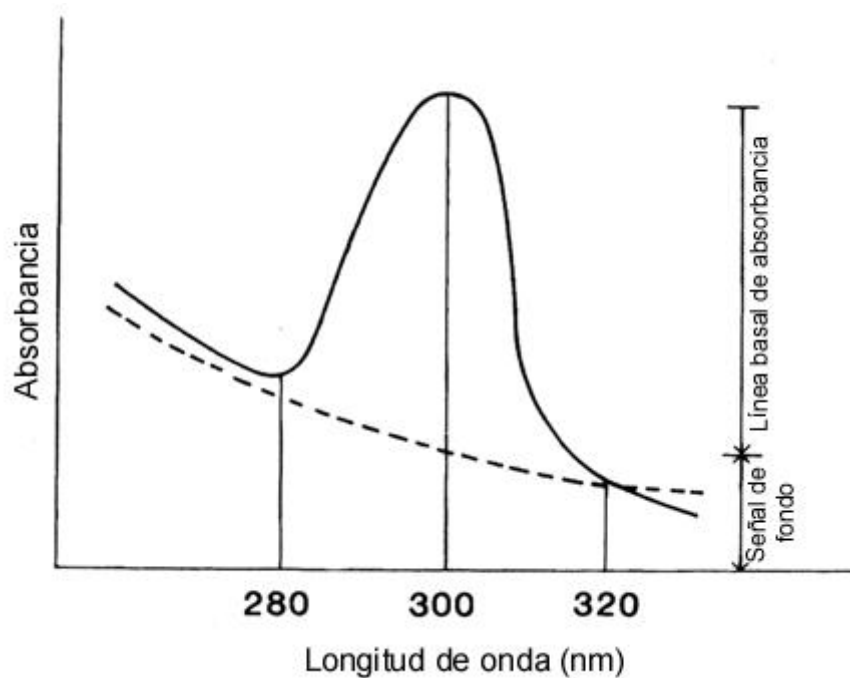


Figura 23-8 Curvas espectrales para el cromóforo e interferente, línea llena, y para interferentes basales, línea de puntos. El promedio entre A_{280} y A_{320} representa la

absorbancia basal a $A_{\text{máx}}$ para el cromóforo (300).

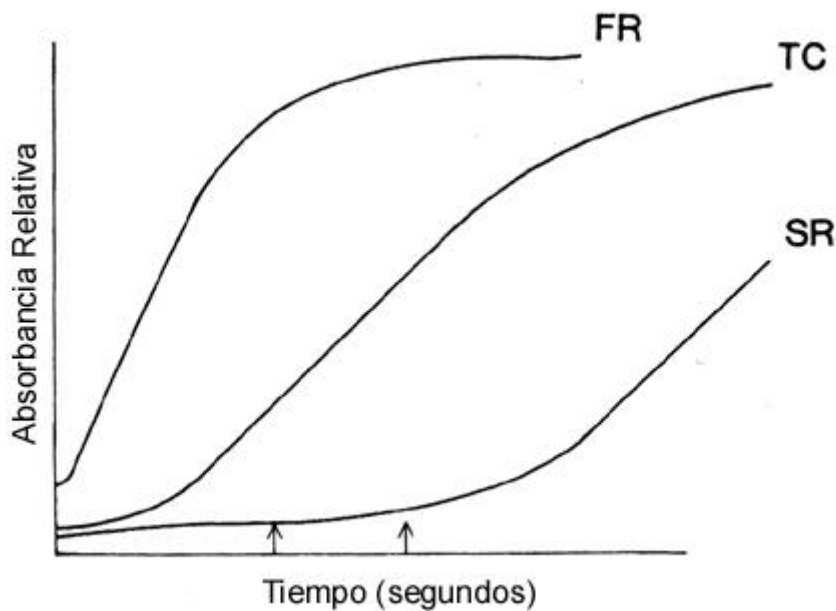


Figura 23-9 Curvas de absorbancia relativa en función del tiempo de reacción del picrato alcalino, para creatinina (CV), interferentes de reacción lenta (VB), e interferentes de reacción rápida (VA). *Flechas*, intervalo durante el cual la absorbancia refleja principalmente los cambios atribuibles a la reacción de la CV.

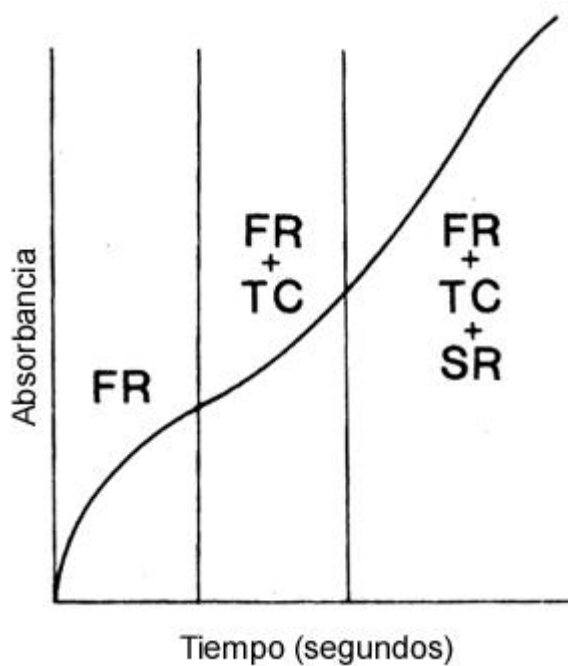




Figura 23-10 Reacción de una mezcla compleja de interferentes de reacción rápida (VA) y reacción lenta (VB) más creatinina (CV). Solo midiendo el cambio de absorbancia en función del tiempo es posible aislar la reacción de la CV reduciendo al mínimo las interferencias a VB y VA.

BARBITÚRICOS

UAICAR **inc V** Si hay anemia megaloblástica, 2138

SALANINA AMINOTRANSFERASA **inc V** Ocurre con intoxicación probable origen muscular, 2206

SFOSFATASA ALCALINA **inc V** Caso raro de hepatotoxicidad, 0217

UACIDO AMINOLEVULINICO **inc V** Puede precipitar porfiria agua, 0781

SAMITRIPTILINA **dec V** Estimula metabolismo de antidepresivos tricíclicos, 0878

PAMONIACO **inc V** Metabolismo afectado en perros, 2045

SASPARTATO AMINOTRANSFERASA **inc V** Ocurre con intoxicación, probable origen muscular, 2206

O RATO METABOLISMO BASAL **dec V** Disminución en aproximadamente 10%, 0153

SBILIRUBINA **dec V** Induce glucuroniltransferasa en recién nacidos, 0879

SBILIRRUBINA **inc V** Raros casos de ictericia siguientes a su empleo, 0217

SRETENCION DE BSP **dec V** Aumenta conjugación con glutatión, 0798

SRETENCION DE BSP **inc V** Puede aumentar retención si se da en 24 hs, 0797

SCALCIO **Z M** Sin efecto sobre fluorescencia de claceina, 1384

SCOLINESTERASA **dec V** Puede inhibir actividad, 0985

BCOPROPORFIRINA **inc V** Puede precipitar porfiria cutánea aguda, 0781

FCOPROPORFIRINA **inc V** Puede precipitar porfiria cutánea aguda, 0781

UCOPROPORFIRINA **inc V** Puede precipitar porfiria cutánea aguda, 0781

PCORTISOL **dec V** Si se usa preoperatoriamente menor concentración, 2081

SCREATINAQUINASA **inc V** Ocurre con intoxicación, probable origen muscular, 2206

SCREATININA **inc V** Shock e insuficiencia renal en intoxicación, 1400

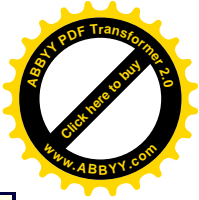
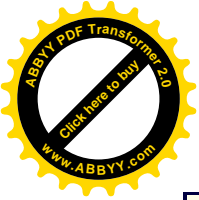
UDOPAMINA **Z V** Sin efecto por adicción o interrupción, 2067

UEPINEFRINA **Z V** Sin efecto por adicción o interrupción, 2067

UESTRIOL **inc V** En teoría debido a mayor hidroxilación, 0014

UFIGLU **inc V** Si hay anemia megaloblástica, 2138

SFOLATO **dec V** Puede causar anemia megaloblástica (afecta



absorción), 2138

Figura 23-11 Ejemplo del formato utilizado en la edición especial de Clinical Chemistry : “Effects of drugs on clinical laboratory tests” (Del O’Kell, Elliot JR: *Clin Chem* 16:161-165, 1970.)

SECCIÓN 2. FISIOPATOLOGÍA

CAPÍTULO 24

24. Fisiología y Fisiopatología del Agua Corporal y los Electrolitos

Leonard I. Kleinman

John M. Lorenz

Compartimentos de agua corporal.

Definiciones

Volumen de los compartimentos de agua corporal

Cambios por la maduración en los volúmenes de los compartimentos de agua corporal

Composición de los compartimentos de agua corporal

Presión osmótica y osmolaridad de los fluidos corporales.

Regulación de la osmolaridad y el volumen del compartimento del fluido corporal

Compartimento extracelular

Metabolismo del sodio y factores natriuréticos

Compartimentos de plasma y fluido intersticial

Compartimento intracelular

Metabolismo del agua

Balance de agua

Alteraciones del balance de agua

Deshidratación

Sobrehidratación



Metabolismo de sodio

Balance de sodio

Alteraciones del balance de sodio

Anormalidades de la concentración de sodio plasmático

Metabolismo del potasio

Balance de potasio

Alteraciones del balance de potasio

Anormalidades de la concentración plasmática de potasio

Metabolismo del cloruro

Balance de cloruro

Alteraciones del balance de cloruro

Anormalidades de la concentración plasmática de cloruro

Métodos de análisis

Hiato aniónico

Cloruro

Osmolalidad

Sodio y potasio

OBJETIVOS

- ♦ Relacionar la composición de electrolitos de los dos principales compartimentos del agua corporal total.
- ♦ Definir el hiato aniónico y exponer su significación clínica; calcular e interpretar los resultados del hiato aniónico a partir de determinados datos.
- ♦ Describir la regulación homeostática de sodio, potasio, cloruro y agua corporal.
- ♦ Definir los diferentes estados de disminución o incremento de las concentraciones de electrolitos plasmáticos en términos de un exceso o déficit de agua o electrolito.
- ♦ Enumerar y describir brevemente los síntomas y al menos dos causas de las condiciones clínicas asociadas con el incremento y la disminución de cantidades de electrolitos y agua corporal.

Términos Clave

acidosis pH del fluido corporal anormalmente bajo. *Respiratoria* - causada por una PCO_2 anormalmente alta; *Metabólica* - causada por una concentración de bicarbonato anormalmente baja.

adipsia Ausencia de sed.

agua corporal total (ACT) Toda el agua contenida en el cuerpo, tanto dentro como fuera de las células, incluyendo aquellas contenidas en los sistemas gastrointestinal y genito-urinario.

agua extracelular (AEC) Agua externa a las membranas; anatómica: toda agua externa a las membranas celulares; fisiológica: plasma y agua corporal en



la cual pequeños solutos pueden difundirse; excluye la porción transcelular del agua anatómica extracelular; incluye el plasma y el fluido intersticial (ver Fig. 24-1).

agua intracelular (AIC) Agua contenida en las células del cuerpo; agua dentro de las membranas celulares.

agua libre Agua que no contiene soluto.

agua transcelular La porción de agua extracelular que está rodeada por una membrana epitelial, cuyo volumen y composición se determinan por la actividad celular de esa membrana.

alcalosis pH del fluido corporal anormalmente alto; respiratoria: causada por una PCO_2 anormalmente baja; metabólica: causada por una concentración de bicarbonato anormalmente alta.

aldosterona Hormona mineralocorticoide secretada por la corteza adrenal que influye en el metabolismo del sodio y el potasio.

anabolismo Proceso de asimilación de materia nutritiva y su conversión en sustancia viva.

angiotensina Polipéptido vasopresor producido por la acción enzimática de la renina sobre el angiotensinógeno. Una enzima convertidora del pulmón extrae dos aminoácidos C-terminales del decapeptido inactivo angiotensina I para formar el octapéptido biológicamente activo angiotensina II.

angiotensinógeno Globulina sérica producida en el hígado, precursora de la angiotensina.

anión Ion que transporta una carga negativa.

anorexia Disminución del apetito por los alimentos.

arritmia Irregularidad del ritmo cardíaco.

ascitis Acumulación de fluido en la cavidad peritoneal.

asfixia Interferencia con la entrega de oxígeno al tejido y la extracción de dióxido de carbono del mismo.

barorreceptor Terminal nerviosa que responde al cambio en la presión.

catabolismo Degradación de compuestos químicos complejos en otros más simples en el cuerpo. Con frecuencia conlleva la producción de energía.

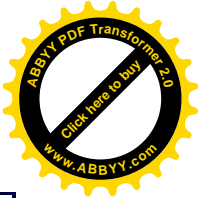
cación Ion que transporta una carga positiva.

células yuxtaglomerulares Células del músculo liso que sintetizan y almacenan renina y la liberan en respuesta a una disminución de la presión de perfusión renal, a un incremento de la estimulación de los riñones por el nervio simpático, o a una disminución de la concentración de sodio en el fluido del túbulo distal.

cirrosis Enfermedad progresiva del hígado caracterizada por el daño a las células del parénquima hepático.

coloide Según se usa en este capítulo, este término se aplica a las grandes moléculas en el cuerpo, a las cuales el endotelio capilar y la membrana celular son impermeables.

deshidratación Disminución anormal en el agua corporal total (ver Tabla 24-4); hipernatrémica: pérdida neta de sodio y agua del cuerpo, excediendo la



pérdida neta de agua a la de sodio; hiponatémica: pérdida neta de sodio y agua del cuerpo, excediendo la pérdida neta de sodio a la de agua; normonatémica: pérdida neta de sodio y agua extracelulares del cuerpo en iguales proporciones; simple: pérdida neta de agua corporal sola sin pérdida neta de sodio.

diabetes insípida Excreción crónica de grandes cantidades de orina hipoosmótica causada por la incapacidad de concentrar la orina debido a la carencia de la producción, secreción o efecto de la hormona antidiurética, HAD (o HDA por sus siglas en inglés). *Pituitaria* - causada por una inadecuada síntesis o secreción de la HAD; *Nefrogénica* - causada por la no respuesta de los túbulos renales a la HAD.

difusión pasiva Movimiento de iones o soluto a través de una membrana, bajo gradientes eléctricos o químicos, sin consumo de energía ni proceso de transporte.

edema incremento del volumen del fluido intersticial.

equilibrio de Gibbs-Donnan Distribución constante de iones permeables y potencial transmembrana que resulta a través de una membrana semipermeable cuando existe un ion no permeable en cantidades desiguales en cualquiera de los lados de la membrana, y el movimiento del solvente a través de la membrana semipermeable es exactamente opuesto (Fig. 24-7).

fluido intersticial (FI) Agua extravascular, extracelular.

hiperaldosteronismo Trastorno causado por la secreción excesiva de aldosterona y caracterizada por alcalosis hipopotasémica, debilidad muscular, hipertensión, poliuria, polidipsia y concentraciones normales o elevadas de sodio plasmático.

hipercloremia Concentración anormalmente alta de cloruro plasmático.

hipernatremia Concentración anormalmente alta de sodio plasmático.

hiperosmótica Que denota una presión osmótica efectiva mayor que la del plasma.

hiperpotasemia Concentración anormalmente alta de potasio plasmático.

hipertónica Que denota una presión osmótica teórica mayor que la del plasma.

hipocloremia Una concentración anormalmente baja de cloruro plasmático.

hiponatremia Una concentración anormalmente baja de sodio plasmático; por dilución: hiponatremia causada por un exceso de agua (con respecto al sodio) en el compartimento extracelular.

hipopotasemia Concentración anormalmente baja de cloruro plasmático.

hiposmótico Que denota una presión osmótica efectiva menor que la del plasma.

hipotálamo Porción del cerebro debajo del tálamo y conectada a la glándula pituitaria (ver Capítulo 43).

hipotónico Que denota una presión osmótica teórica menor que la del plasma.

hipovolemia Volumen sanguíneo anormalmente bajo.

hormona antidiurética (/HAD) Hormona peptídica de la neurohipófisis



que actúa en el túbulo colector del riñón para permitir un incremento de la reabsorción de agua y por lo tanto una disminución de la excreción de agua libre por el riñón. También se conoce como vasopresina.

intoxicación por agua Incremento en el agua libre en el cuerpo que resulta en una hiponatremia dilucional.

isquemia Disminución en el flujo sanguíneo arterial por debajo del nivel necesario para satisfacer las demandas metabólicas del tejido u órgano en cuestión.

macromolécula Molécula de tamaño coloidal, principalmente proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos.

nefrotoxina Sustancia que provoca disfunción o muerte de las células del parénquima renal con cierto grado de especificidad.

oliguria Excreción anormalmente baja de orina, o sea, menor de 400 mL/ día en un adulto.

osmol El número total de moles de un soluto en solución después de su disociación.

osmolaridad Concentración osmótica expresada en osmoles o miliosmoles de soluto por litro de solvente (ver capítulo 14).

ósmosis Movimiento de agua a través de una membrana semipermeable de una solución con baja concentración de partículas de soluto a una solución con alta concentración de partículas de soluto.

parestesia Sensación anormal espontánea, tal como ardor, picazón, entumecimiento y otros.

péptidos atriales natriuréticos (PAN) Péptidos liberados por la aurícula del corazón que incrementan la excreción de sodio por el riñón. Algunos péptidos son también liberados por el cerebro y por el riñón (urodilatina).

pérdida imperceptible de agua Evaporación de agua a través de la piel o desde el tracto respiratorio.

plasma Fluido corporal extracelular, intravascular.

polianiónico Que posee múltiples cargas negativas.

polidipsia Consumo excesivo de fluido secundario a una sed extrema; polidipsia psicogénica secundaria a un trastorno psiquiátrico, sin una lesión orgánica demostrable.

poliuria Excreción excesiva de orina, o sea, más de 1 a 2 L/día en el adulto.

presión osmótica Fuerza necesaria para oponerse exactamente a la ósmosis en una solución a través de una membrana semipermeable.

presión osmótica coloidal La presión osmótica efectiva del plasma y el fluido intersticial a través del endotelio capilar, mayormente resultante de la presencia de proteína.

pseudohiperpotasemia Concentración plasmática de potasio anormalmente alta en una muestra obtenida de un paciente, en ausencia de una verdadera elevación de la concentración plasmática de potasio en ese paciente.

receptor de distensión Terminal nerviosa que responde al estiramiento.

renina Enzima producida, almacenada y secretada por las células yuxtaglomerulares del riñón, la cual actúa sobre la angiotensina circulante para



formar angiotensina I.

requerimientos obligatorios de agua Volumen mínimo de agua necesario para reemplazar la pérdida imperceptible de agua y excretar la carga renal de soluto existente cuando la orina está concentrada al máximo.

semipermeable Permeable a ciertas moléculas pero no a otras; generalmente permeable al agua.

síndrome de secreción inapropiada de la hormona antidiurética Conjunto de hallazgos, incluyendo la hipotonicidad del plasma, hiponatremia e hipertonidad de la orina con excreción continuada de sodio, el cual es producido por una excesiva secreción de HAD y que mejora con la restricción de agua.

transporte activo Paso de iones o moléculas a través de una membrana celular mediante un proceso que consume energía. Esta energía es generada por el metabolismo celular.

trasudación El paso de un fluido a través de una membrana con casi todos los solutos contenidos en el fluido permaneciendo en solución o suspensión.

urodilatina Péptido similar en estructura al péptido natriurético atrial (PAN) pero liberado por el riñón. La urodilatina incrementa la excreción renal de sodio.

El agua es el componente más abundante del cuerpo humano, representando aproximadamente el 60 % de la masa corporal en un adulto normal. El agua es importante no sólo debido a su abundancia sino además porque es el medio en el cual los solutos corporales, tanto orgánicos como inorgánicos, se disuelven y las reacciones metabólicas tienen lugar. La discusión en este capítulo dirige su atención a (1) la descripción de la compartimentalización dinámica del régimen permanente de fluido corporal y sus solutos inorgánicos, (2) los mecanismos fisiológicos involucrados en el mantenimiento de esta compartimentalización y (3) los eventos fisiopatológicos que ocurren durante ciertos estadios clínicos que alteran la composición de los fluidos corporales.

Compartimentos de Agua Corporal

Definiciones (Figs.. 24-1 y 24-2)

El agua corporal total (ACT) incluye ambas, el agua que está dentro y fuera de las células y el agua normalmente presente en los sistemas gastrointestinal y genito-urinario. El ACT puede ser teóricamente dividida en dos grandes compartimentos. El *agua extracelular anatómica (AEC)*, que incluye toda el agua externa a las membranas celulares y constituye el medio a través del cual tiene lugar todo el intercambio metabólico. El *agua intracelular (AIC)*, que incluye toda el agua dentro de las membranas celulares y constituye el medio en el cual ocurren las reacciones químicas del metabolismo celular. Este compartimento es heterogéneo y discontinuo; el interior de cada una de las otras células célula por la membrana celular semipermeable.

El AEC anatómica está funcionalmente subdividida en *agua extracelular fisiológica* y



agua transcelular. El AEC fisiológica es la porción del AEC anatómica cuyo volumen puede ser medido directamente; incluye el *plasma* (agua intravascular) y el *fluido intersticial* (FI). El FI es el fluido que baña directamente las células del cuerpo, el cual incluye agua extravascular y extracelular en el cual los iones y las pequeñas moléculas se difunden libremente desde el plasma. Adicionalmente, hay espacios potenciales en el cuerpo (cavidades pericardiaca, pleural, peritoneal y sinovial) que están normalmente vacíos a excepción de unos pocos mililitros de un fluido lubricante viscoso que son considerados parte del compartimento del FI. El agua transcelular incluye el agua presente en los compartimentos extracelulares, rodeada por una membrana epitelial, cuyo volumen y composición están determinados por la actividad celular de esa membrana. Estos compartimentos heterogéneos incluyen el humor acuoso en el ojo, el líquido cefalorraquídeo y el agua dentro de los sistemas gastrointestinal, genito-urinario y naso-respiratorio. El volumen de la porción de agua transcelular del AEC anatómica no está incluida en las medidas convencionales de agua extracelular (ver capítulo 41).

Volumen de los compartimentos de agua corporal (Tabla 24-1)

El ACT constituye el 65 % del peso corporal en el promedio de los hombres adultos y el 55 % en las mujeres. Esta diferencia entre hombres y mujeres principalmente el resultado de las diferencias en la grasa corporal. Como porcentaje del peso corporal total, el ACT varía inversamente con el contenido de grasa corporal, de aproximadamente 70 % en personas muy delgadas a 50 % en personas obesas.

El volumen fisiológico de AEC es aproximadamente el 20 % del peso corporal y un tercio del ACT en el adulto promedio. A diferencia del ACT, ni los volúmenes fisiológicos ni anatómicos de AEC pueden ser medidos con exactitud. El volumen plasmático puede ser medido exactamente y es aproximadamente el 5 % del peso corporal. El volumen del fluido intersticial se calcula como la diferencia entre los volúmenes de AEC y de plasma. Este volumen es aproximadamente el 15 % del peso corporal y una cuarta parte del ACT. El agua intracelular se calcula como la diferencia entre los volúmenes de ACT y el AEC. Este es igual al 40 % del peso corporal y dos tercios del ACT en el adulto promedio. El volumen de agua intracelular calculada de este modo incluye el agua transcelular, el cual se ha estimado como el 1 % al 3 % del peso corporal.

Cambios por la maduración en los volúmenes de los compartimentos de agua corporal (Fig. 24-3)

La fracción de peso corporal que es agua y la proporción de ACT que es AEC y AIC no permanecen constantes durante el crecimiento. Cuando se expresan como porcentaje del peso corporal, el ACT disminuye gradualmente durante la gestación intrauterina y la niñez temprana, alcanzando un valor aproximado al del adulto alrededor de los 3 años de edad. Durante este tiempo el AEC (expresada como porcentaje del peso corporal) disminuye y el AIC (expresada como porcentaje del peso corporal) se incrementa. Así, el AEC pasa a ser una proporción menor y el AIC una proporción mayor del ACT. El volumen de plasma permanece constante entre un 4 % y 5 % del peso corporal durante toda la vida. Desde luego, los volúmenes absolutos de ACT, AEC, AIC y plasma se incrementan con el crecimiento.

Composición de los compartimentos de agua corporal (Tabla 24-2)

Compartimento de plasma.



El compartimento de plasma es el único cuya composición es cuantificable directamente. Obsérvese que la concentración de iones en el plasma es menor que aquella en el *agua plasmática*. La razón es que el plasma está compuesto de agua, iones y macromoléculas. Los iones están presentes sólo en la fase acuosa. El término *agua plasmática* se utiliza para indicar esta fracción acuosa a diferencia del resto, el cual está compuesto de proteínas, lípidos y macromoléculas. La concentración de iones en el plasma es menor que aquella en el agua plasmática debido a que el plasma contiene tanto al agua plasmática (en la cual están disueltos los iones) como a la fracción de macromoléculas (en la cual los iones no se disuelven). El agua plasmática representa sólo el 93 % del total del volumen plasmático. En consecuencia, la concentración de iones en el plasma es el 93 % de la concentración en el agua plasmática (ver pág. 461). Debe hacerse énfasis en que aunque la concentración de iones en el plasma es esta proporción convencionalmente medida y publicada, es la concentración de iones en el agua plasmática lo que afecta la distribución de iones a través del endotelio capilar. Si hay una cantidad anormalmente incrementada de macromoléculas en el plasma (tales como lípidos), la concentración de iones plasmáticos medida será menor aun cuando la concentración de iones en el agua plasmática y las resultantes actividades químicas de estos iones pueda ser normal. Además de las proteínas, el plasma contiene concentraciones altas de sodio y cloruro, moderadas de bicarbonato y bajas de calcio, magnesio, fosfato, sulfato y ácidos orgánicos.

La suma de todas las cargas de los iones cargados positivamente (cationes) debe ser igual a la suma de todas las cargas de los iones cargados negativamente (en la medicina clínica, se miden las concentraciones plasmáticas de sodio, potasio, cloruro y bicarbonato). La suma de estos cationes medidos excede la de los aniones medidos. Por eso, la suma de los aniones plasmáticos no medidos debe ser mayor que la de los cationes no medidos. La diferencia entre la suma de los cationes *medidos* y la suma de los aniones *medidos* se conoce como el hiato aniónico y se calcula como $[Na^+] + [K^+] - [Cl^-] - [HCO_3^-]$ o también como $[Na^+] - [Cl^-] - [HCO_3^-]$ (ver pág. 457). Esta última forma se utiliza frecuentemente porque la concentración de potasio plasmático es relativamente constante y puede estar falsamente elevada debido a hemólisis (ver pág. 463). Debido a que la concentración total de cationes plasmáticos debe ser igual a la concentración total de aniones plasmáticos y la disminución en los cationes no medidos tiene poco efecto en el cálculo, un incremento del hiato aniónico es generalmente indicativo de un incremento en la concentración de uno o más de los aniones no medidos (Fig. 24-4). Una disminución en el hiato aniónico sugiere la posibilidad opuesta. El uso clínico más frecuente del hiato aniónico es en el diagnóstico diferencial de la acidosis metabólica (ver capítulo 25).

Compartimento del fluido intersticial.

Normalmente en el fluido intersticial no hay volúmenes suficientes para realizar análisis químicos. La mayor diferencia entre el FI y el plasma es la presencia de proteína en el plasma y su relativa ausencia en el FI. Aunque pudiera esperarse que las concentraciones de solutos que difunden libremente en el FI fueran iguales a aquellas en el agua plasmática, esto es verdad sólo para los solutos no cargados. La presencia de moléculas de proteínas polianiónicas en el plasma, las cuales no pueden cruzar las membranas semipermeables, conduce al equilibrio de Gibbs-Donnan (ver pág. 448). Este equilibrio resulta en concentraciones de cationes en el



agua plasmática ligeramente mayores que aquellas en el FI y concentraciones de aniones en el agua plasmática ligeramente menores que aquellas en el FI. Los valores de concentraciones iónicas en FI mostradas en la Tabla 24-2 son aproximaciones teóricas basadas en los cálculos del equilibrio de Gibbs-Donnan.

Compartimento del agua intracelular.

Las concentraciones de soluto en agua celular no pueden ser determinadas directamente. El compartimento de AIC es heterogéneo; existen importantes diferencias en las concentraciones de soluto intracelular entre diferentes tipos de célula. Sin embargo, algunas características de la mayoría de los fluidos celulares son cuantitativamente similares y distinguen al AIC del AEC. Los principales cationes del AIC son potasio y magnesio, y la concentración de sodio es siempre baja; los principales aniones de los fluidos celulares son proteínas, fosfatos orgánicos y sulfatos, mientras que las concentraciones de cloruro y bicarbonato son bajas. El perfil presentado en la Tabla 24-2 es de células musculares.

Presión osmótica y osmolaridad de los fluidos corporales.

La presión osmótica es un factor importante que determina la distribución de agua entre los compartimentos de agua corporal. (Ver capítulo 14 para una descripción de las propiedades coligativas que determinan la presión osmótica.) La presión osmótica *teórica* (y la atractibilidad del agua) de una solución es proporcional a su osmolaridad. La presión osmótica teórica de una solución a la temperatura corporal se calcula así:

$$\text{Presión osmótica teórica (mm Hg)} = 19.3 \text{ (mm Hg/mOsm/L)} \times \text{Osmolaridad (mOsm/L)} \quad \text{Ec. 24-1}$$

Hay que señalar que la permeabilidad del soluto de membranas biológicas específicas no está considerada en este cálculo. La osmolaridad y presión osmótica teórica de cada uno de los compartimentos de agua corporal se relacionan en la Tabla 24-2.

La presión osmótica puede ser contemplada simplemente como la fuerza que tiende a mover el agua de las soluciones diluidas a las soluciones concentradas. Cuando una membrana es permeable a un soluto, el soluto no ejerce presión osmótica a través de la membrana, él no contribuye a la presión osmótica *efectiva* de la solución. La presión osmótica efectiva de la solución depende entonces del número total de partículas en solución y de las características de permeabilidad de la membrana particular en cuestión. Cuanto mayor es la permeabilidad de una membrana a un soluto, menor es la presión osmótica efectiva de una solución de ese soluto a cualquier osmolaridad dada. Por ejemplo, las membranas celulares son mucho más permeables a la urea que al sodio y al cloruro. Por eso, la presión osmótica efectiva de una solución de urea a través de una membrana celular sería mucho menor que la de una solución de NaCl de la misma osmolaridad. La medida de la osmolaridad del compartimento de agua corporal es una medida sólo de su presión osmótica *teórica*, no efectiva.

Una solución con una presión osmótica *efectiva* mayor que la del plasma se dice que es *hiperosmótica* con relación al plasma. Una solución con una presión osmótica teórica mayor que la del plasma se dice que es *hipertónica*. Las soluciones *hipoosmótica* e *hipotónica* son aquellas con presiones osmóticas efectiva y teórica, respectivamente, menores que la del

plasma.

La presión osmótica efectiva del plasma y del FI a través del endotelio capilar que los mantiene separados se conoce como su presión osmótica *coloidal*. El endotelio capilar es libremente permeable a la mayoría de los solutos en el plasma y el FI. Por eso, estos solutos contribuyen a la presión osmótica teórica pero no a la efectiva. El endotelio capilar es impermeable a grandes moléculas proteicas (coloides) bajo circunstancias normales. Son estos coloides los responsables por la presión osmótica efectiva del plasma y el FI.

Regulación de la Osmolaridad y el Volumen de los Compartimentos de los Fluidos Corporales

Compartimento extracelular

La regulación de la osmolaridad y el volumen del AEC depende del control independiente de cada una de estas variables por el hipotálamo, el sistema renina-angiotensina-aldosterona, el factor natriurético atrial y el riñón.

Metabolismo de agua e hipotálamo. (Fig. 24-5)

Los centros reguladores de entrada y salida de agua están localizados en regiones separadas del hipotálamo en el cerebro. Las neuronas en cada una de estas regiones responden al aumento de la osmolaridad del AEC, a la disminución del volumen intravascular y a la angiotensina II. Un aumento de la osmolaridad del AEC estimula estas neuronas directamente provocando su contracción (el aumento de la osmolaridad del FI que se encuentra bañando cualquier célula provoca que el agua salga de la célula hacia el FI; ver p.447). Una disminución del volumen intravascular provoca una reducción en la actividad de los receptores de distensión localizados en la aurícula del corazón, la vena cava inferior y las venas pulmonares y, una reducción en la actividad de los receptores de la presión sanguínea en la aorta y las arterias carótidas. La transmisión de esta información al sistema nervioso central estimula las neuronas situadas en las regiones del hipotálamo relacionadas con la entrada y la salida de agua. La angiotensina II circulante parece actuar directamente estimulando las neuronas localizadas en estas regiones de control del agua del hipotálamo. La estimulación de las neuronas localizadas en la región que controla la entrada de agua produce la sensación consciente de sed y de este modo estimula el consumo de agua. La estimulación de las neuronas situadas en la región que controla la salida de agua produce la liberación de la hormona antidiurética (HAD) de la parte posterior de la glándula pituitaria. La HAD estimula la reabsorción de agua en los conductos colectores del riñón, lo cual resulta en la formación de orina hipertónica y la disminución de la salida de agua libre (agua sin soluto). La integración de todos estos mecanismos de control que gobiernan la entrada y salida de agua asegura el mantenimiento de un balance de agua apropiado.

El metabolismo de agua y sodio y el sistema renina-angiotensina-aldosterona. (Fig. 24-6)

El sistema renina-angiotensina-aldosterona funciona como un mecanismo de regulación neurohormonal para el contenido de sodio y agua del cuerpo, la presión arterial y el balance de potasio. La renina es una enzima proteolítica sintetizada, almacenada y secretada por las células de los cuerpos yuxtglomerulares del riñón. La secreción de renina se incrementa por



la disminución de la presión de perfusión renal, la estimulación de los nervios simpáticos de los riñones y la disminución de la concentración de sodio en el fluido del túbulo distal. La renina convierte el angiotensinógeno (un polipéptido sintetizado en el hígado) en angiotensina I. La angiotensina I se convierte en angiotensina II en el pulmón y el riñón. La angiotensina II es un potente vasopresor. Adicionalmente, la angiotensina II estimula la secreción de aldosterona por la corteza adrenal, el mecanismo de la sed y la secreción de HAD. La aldosterona estimula la reabsorción de sodio en la nefrona distal. Como una consecuencia de la reabsorción de este sodio, el agua se retiene en el organismo.

El metabolismo del sodio y los factores natriuréticos.

Hay otras sustancias humorales además del sistema renina-angiotensina-aldosterona que tienen un papel en la regulación del balance de sodio. La más ampliamente estudiada es una sustancia natriurética producida por las células de la aurícula cardíaca llamada péptido natriurético atrial (PAN), o atriopeptina. El péptido natriurético atrial se presenta al menos en tres formas: la forma A (PNA), la forma B (PNB, también conocido como el “péptido natriurético cerebral” porque se encuentra en el cerebro, al igual que en el corazón), y la forma C del péptido (PNC). Algunos estudios sugieren que el PNA puede jugar un papel principal en la regulación del sodio mediante el aumento de la excreción de sodio renal. Sin embargo, estudios más recientes indican que los efectos del PNA son modestos en condiciones normales, pero pueden ser más importantes bajo ciertas condiciones clínicas tales como una insuficiencia cardíaca congestiva. Aunque hay un efecto directo del PNA sobre el riñón, muchas de sus acciones son secundarias a la inhibición del sistema renina-angiotensina-aldosterona. La *urodilatina*, un péptido de estructura química similar al PNA, pero formado directamente en el riñón, puede ser más importante en la regulación renal del balance de sodio que el propio PAN.

Otra sustancia humoral que puede ser importante en la regulación del sodio es la sustancia inhibitoria de la ATPasa de Na^+ y K^+ (también llamada “sustancia análoga al digitalis”), la cual inhibe la bomba de sodio responsable de la reabsorción de sodio en los túbulos renales.

Los factores y mecanismos involucrados en el control de la excreción de agua y sodio por el riñón se discuten en el capítulo 26.

Control de la osmolaridad del agua extracelular.

La *osmolaridad* del AEC es regulada por el control hipotalámico de la entrada de agua (mecanismo regulador de la sed) y la excreción renal de agua libre (ver Fig. 24-5). El incremento de la osmolaridad del AEC estimula la entrada de agua y la secreción de la HAD. La secreción de la HAD disminuye la excreción de agua renal. El incremento de la entrada de agua y la disminución de la excreción de agua renal conduce a un balance positivo de agua, o esa, mayor ganancia que pérdida de agua. El balance positivo de agua disminuye la osmolaridad del AEC a la normal. Lo opuesto ocurre con una disminución de la osmolaridad del AEC: se inhiben la sed y la secreción de HAD. Esto conduce a un balance negativo de agua (mayor pérdida que ganancia de agua) y la osmolaridad del AEC se restablece a la normal.

Control del volumen de agua extracelular.



El control del *volumen* del AEC depende del control integrado del *balance de agua y sodio* a través de las regiones del hipotálamo responsables de la entrada y salida de agua, el sistema renina-angiotensina-aldosterona, el factor natriurético atrial y el riñón.

Cuando la salida de agua y sodio exceden la entrada (el balance de agua y sodio son negativos), el volumen de AEC se contrae. La disminución asociada en el volumen plasmático produce una reducción en el retorno sanguíneo venoso al corazón y la reducción de la eyección cardíaca. Estos cambios cardiovasculares producen los siguientes efectos:

1. Estimulación de la región que controla la entrada de agua del hipotálamo y el centro de la sed (ver Fig. 24-5)
2. Estimulación de la región que controla la redimiento de agua del hipotálamo y secreción de HAD (ver Fig. 24-5)
3. Estimulación del sistema renina-angiotensina-aldosterona y aumento de la angiotensina II (ver Fig. 24-6)
4. Inhibición de la liberación del factor natriurético atrial
5. Retención de sodio y agua por el riñón.

El resultado neto de estos efectos es que el balance de agua y sodio se vuelve positivo y el volumen de AEC vuelve a la normalidad.

La expansión del volumen de AEC produce la misma secuencia de eventos en el sentido opuesto, con pérdida neta de agua y sodio y restauración a la normalidad del balance de AEC.

Compartimentos de plasma y fluido intersticial

La distribución de agua y soluto entre los compartimentos del plasma y del fluido intersticial depende de una superficie intacta del endotelio capilar y se controla pasivamente mediante la interacción de las fuerzas hidrostáticas, osmóticas y electroquímicas. El endotelio capilar funciona como un tubo continuo con numerosos canales intercelulares de 4 a 5 nm de diámetro. Es totalmente permeable al agua y a solutos pequeños y relativamente impermeable a las proteínas.

Distribución del agua.

La distribución de agua a través de la superficie endotelial está controlada por el equilibrio entre las fuerzas que tiende a mover el agua del plasma hacia el FI (fuerzas de filtración) y las fuerzas que tienden a mover el agua del FI hacia el plasma (fuerzas de reabsorción). La principal fuerza de filtración es la presión hidrostática del plasma en el capilar. Una fuerza de filtración mucho más débil es la presión osmótica coloidal del FI. Debido a que la concentración de proteínas en el FI es despreciable, la presión osmótica coloidal es baja. Otra fuerza de filtración débil es una pequeña presión hidrostática *negativa* del FI. La principal fuerza de reabsorción es la presión osmótica coloidal ejercida a través del endotelio capilar por las proteínas plasmáticas. En sentido general, la presión hidrostática plasmática (la cual tiende a conducir el agua fuera del capilar) excede la presión osmótica coloidal del plasma (la cual tiende a introducir el agua en el capilar) en la terminal arteriolar del capilar, de modo que ocurre una filtración neta. A medida que el plasma se mueve por el capilar y ocurre la filtración, la presión hidrostática plasmática disminuye y la concentración de proteína plasmática (y por tanto la presión osmótica coloidal del plasma) aumenta a lo largo

del capilar de modo que ocurre la reabsorción neta hacia la terminal venosa del capilar. Esto se describe esquemáticamente en la Fig. 24-7. En total, la filtración sobrepasa a la reabsorción, por ello el agua debe regresar al plasma desde el compartimento del FI por vía del sistema linfático para prevenir el edema (definido como un incremento anormal en el FI).

Distribución del soluto.

Las pequeñas diferencias en las concentraciones de los diferentes solutos extracelulares a través del endotelio capilar son el resultado de la presencia de moléculas de proteínas polianiónicas (esto es, que tienen múltiples cargas negativas) en el plasma, a las cuales el endotelio capilar es relativamente impermeable. Esto trae como resultado la existencia del equilibrio de Gibbs-Donnan (Fig. 24-8): la presencia de macromoléculas polianiónicas no permeables restringidas a un lado de la membrana que es permeable al solvente y a pequeños iones, establece una distribución característica de los iones permeables. En el estado de equilibrio electroquímico, las concentraciones de *cationes que difunden* son ligeramente *mayores* y las concentraciones de los *aniones que difunden* ligeramente *menores* en el compartimento que contiene las macromoléculas polianiónicas impermeables.

En los casos del calcio y el magnesio, las mayores diferencias entre las concentraciones del agua plasmática y del FI resultan del hecho de que aproximadamente el 45 % del calcio plasmático y el 25 % del magnesio plasmático está unido a proteínas y por lo tanto no difunde.

Compartimento intracelular

La distribución de agua y soluto a través de la membrana celular entre el FI y al AIC depende de la integridad de la membrana celular y de las fuerzas osmóticas y electroquímicas; todos estos factores están sustentados por el metabolismo celular. La membrana celular se comporta como si fuera una película de aceite con numerosos poros de 0.7 nm de diámetro. Esta membrana es altamente permeable al agua pero selectivamente permeable a los solutos. La permeabilidad de la membrana celular a un soluto está directamente relacionada con la solubilidad en lípidos del soluto e inversamente relacionada con su hidrofilia (atracción por el agua) y el tamaño molecular. Otros factores se mantienen constantes, tales como la permeabilidad de la membrana, que es mayor para los aniones que para los cationes,.

Volumen celular.

El volumen celular está controlado por la osmolaridad del FI. La osmolaridad dentro de la célula debe ser igual a la osmolaridad fuera de la célula debido a que es altamente permeable al agua y no puede mantenerse un gradiente de presión hidrostática a través de las membranas de las células animales. El contenido osmótico del compartimento intracelular se mantiene relativamente constante por el metabolismo celular. Por eso, el equilibrio osmótico a través de la membrana celular puede mantenerse al enfrentar los cambios en la osmolaridad del FI sólo al movimiento de agua entre el compartimento intracelular y el espacio intersticial. Una disminución en la osmolaridad del FI provoca el movimiento de agua hacia las células y un aumento del volumen intracelular. Por el contrario, un aumento en la osmolaridad del FI produce un movimiento de agua desde las células y una disminución del volumen intracelular.

Contenido de solutos celulares.

La composición iónica del fluido intracelular se muestra en la Tabla 24-2. Esta



composición es principalmente el resultado de una bomba de transporte iónico (Na^+ , K^+ -ATPasa) dependiente de energía que se encuentra en la membrana celular que expulsa sodio de la célula a cambio de potasio. Adicionalmente, la composición del soluto intracelular depende de la producción intracelular de macromoléculas polianiónicas no permeables. El contenido celular de los restantes iones permeables es el resultado de 1) gradientes electroquímicos producidos por el intercambio de Na y K y las macromoléculas polianiónicas no permeables intracelulares (efecto de Gibbs-Donnan), 2) las características de permeabilidad específicas de la membrana celular a los diferentes iones y 3) otras bombas de transporte de iones específicos dependientes de energía. Los dos últimos factores varían de uno a otro tipo de célula y son responsables de las diferencias en el contenido iónico entre los diferentes tipos de células.

Todos los factores que influyen en el contenido de soluto celular dependen del metabolismo normal de la célula. Cuando el metabolismo celular se altera, como durante la asfixia, soluto y agua entran a la célula, provocando que ésta se hinche.

Metabolismo del Agua

Balance de agua

La osmolaridad del agua extracelular se mantiene constante de 285 a 298 mOsm/L como consecuencia del balance dinámico entre el consumo y la excreción de agua, el cual es controlado por los mecanismos discutidos previamente. El promedio diario de recambio de agua en el adulto es aproximadamente de 2500 mL; sin embargo, el rango de recambio de agua posible es mayor y depende del consumo, del ambiente y de la actividad (Tabla 24-3).

En condiciones normales aproximadamente entre la mitad y las dos terceras partes del consumo de agua es en forma de fluido oral y aproximadamente entre la mitad y la tercera parte es en forma de agua contenida en los alimentos. Además, una pequeña cantidad de agua (de 150 a 350 mL/día) es producida por el metabolismo oxidativo. El consumo de fluido oral es la única fuente de agua que es regulada como respuesta a los cambios en el volumen y la osmolaridad del AEC.

Las vías de excreción de agua incluyen la pérdida de agua urinaria, la pérdida de agua imperceptible, la transpiración sensible (sudor) y la pérdida de agua gastrointestinal. El riñón es el órgano principal que regula el volumen y la composición de los fluidos corporales. El volumen de orina varía en un amplio rango en respuesta a los cambios en el volumen y la osmolaridad del AEC. La excreción de soluto se regula de forma independiente.

La pérdida de agua por difusión a través de la piel y del tracto respiratorio se conoce como *pérdida imperceptible de agua* porque no resulta aparente. Esta es la única vía mediante la cual el agua se pierde sin soluto. La magnitud de la pérdida cutánea de agua imperceptible es una función del área de la superficie corporal; de ahí que sea desproporcionadamente mayor en niños, con respecto a su peso. La pérdida de agua imperceptible varía directamente con la temperatura ambiental, la temperatura corporal y la actividad e inversamente con la humedad ambiental.

La transpiración sensible es despreciable en un ambiente fresco pero puede ser muy grande con el incremento de la temperatura ambiental, la temperatura corporal o la actividad física. El sodio y el cloruro son los principales componentes iónicos del sudor, pero el sudor es casi invariablemente hipotónico con relación al plasma. Un incremento en la osmolaridad del AEC provoca una disminución en la tasa de transpiración sensible.



La pérdida de agua *neta* del tracto gastrointestinal es normalmente pequeña, aproximadamente 150 mL/día. Sin embargo, el *flujo* de agua y electrolitos entre el tracto gastrointestinal y el compartimento de AEC es bastante grande. Por eso, si la reabsorción se deteriora, las pérdidas de agua y electrolitos del tracto gastrointestinal pueden ser grandes, como cuando hay diarrea. Excepto la saliva, que es hipotónica, la concentración total de soluto de la mayoría de las secreciones gastrointestinales es similar a la del FI.

Trastornos del balance del agua

Los trastornos del balance de agua (deshidratación y sobrehidratación) son el resultado de un desequilibrio en la entrada y salida de agua o la entrada y salida de sodio (Tabla 24-4).

Deshidratación.

Déficit de agua. La *deshidratación simple*, definida como una disminución del agua corporal total con el sodio corporal total relativamente normal, puede ser el resultado de una insuficiencia en la reposición obligatoria de las pérdidas de agua o de un fallo de los mecanismos regulador o efector que promueven la conservación de agua por el riñón (ver cuadro a la izquierda, p.450). La deshidratación simple está por definición asociada con la hipernatremia y la hiperosmolaridad porque el balance hídrico es negativo y el balance de sodio es normal. El incremento en la osmolaridad del AEC en la medida que se pierde el agua corporal trae como resultado el movimiento del agua hacia fuera del compartimento del AIC (Tabla 24-4). Por lo tanto, la deshidratación simple conlleva como resultado una contracción de los compartimentos de AEC y AIC.

Causas de Deshidratación (Déficits de Agua y Sodio)
Deshidratación hipernatrémica Privación de agua y alimento Sudor excesivo* Diuresis osmótica (con glucosuria) Terapia diurética*
Deshidratación normonatrémica Vómitos, diarrea Reemplazo de las pérdidas en las condiciones anteriores con líquidos bajos en sodio
Deshidratación hiponatrémica Terapia diurética** Sudor excesivo Enfermedad renal de pérdida de sales Insuficiencia adrenocortical
* Si la ingestión libre de agua es inadecuada. ** Si la ingestión libre de agua es excesiva.



Déficit de agua y sodio. Más frecuentemente la deshidratación es el resultado de un balance negativo neto de ambos, el agua y el sodio. En este caso el balance de agua puede ser más negativo que, igual que, o menos negativo que el balance de sodio (Tabla 24-4). Si el balance de agua es más negativo que el de sodio, el resultado es la deshidratación *hipernatrémica* o *hiperosmolar*; si es igualmente negativo, la deshidratación será *normonatrémica* o *isoosmolar*; y si es menos negativo, se denomina deshidratación *hiponatrémica* o *hipoosmolar*. La deshidratación hipernatrémica es la más común. Algunas causas de déficit de agua y sodio se relacionan en el cuadro de arriba.

El grado de contracción del volumen extracelular para un déficit de sodio dado y el cambio en el volumen intracelular asociado es diferente para cada una de estos tipos de deshidratación (Tabla 24-4). El grado de contracción de volumen extracelular es mínimo con la deshidratación hipernatrémica debido a que el incremento en la osmolaridad del AEC provoca la salida del agua de la célula; el volumen de AIC se contrae. Así, el déficit de agua corporal total es “compartido” por los compartimentos extracelulares e intracelulares. El grado de contracción de volumen extracelular es intermedio con la deshidratación normonatrémica, ya que no se mueve agua hacia fuera ni hacia adentro de las células debido a que no hay cambio en la osmolaridad del AEC. Tampoco hay cambio en el volumen del AIC. El grado de pérdida del volumen del AEC es el mayor con la deshidratación hiponatrémica debido a que la disminución en la osmolaridad del AEC provoca que el agua entre en las células. El volumen de agua intracelular se incrementa en realidad.

Síntomas de deshidratación. Los signos y síntomas de deshidratación incluyen sed, membranas mucosas secas, pliegue cutáneo, disminución de excreción de orina y osmolaridad de la orina aumentada (excepto cuando es causada por una insuficiencia del riñón para mantener el agua libre), aumento del nitrógeno ureico sanguíneo y del hematocrito. Con severidad creciente puede ocurrir debilidad, letargo e hipotensión.

Sobrehidratación.

Exceso de agua. La *intoxicación hídrica* se define como un incremento en el agua corporal total con el sodio corporal total normal. Raras veces ocurre debido a un consumo excesivo de agua (polidipsia). Con mayor frecuencia la intoxicación hídrica es el resultado de un deterioro de la excreción renal de agua libre debido a una secreción excesiva de HAD con respecto a la requerida para mantener la osmolaridad del AEC (síndrome de secreción inapropiada de HAD; ver el cuadro arriba).

Con la intoxicación hídrica la hiponatremia e hipoosmolaridad por *dilución* del AEC producen entrada de agua en las células. Por eso la intoxicación hídrica produce expansión de los compartimentos de AEC y de AIC (Tabla 24-4).

Los síntomas de intoxicación hídrica están relacionados con el grado y tasa de disminución del sodio. Con una disminución en el sodio sérico a valores de 120 a 125 mmol/L, pueden aparecer náuseas, vómitos, convulsiones y coma.

Causas de la Intoxicación por Agua
Polidipsia



Psicogénica - secundaria a un trastorno psiquiátrico
Orgánica, secundaria a una lesión del tálamo anterior

Síndrome de secreción inadecuada de la hormona antidiurética

Incremento de la secreción de HAD por el hipotálamo, secundario
a una disminución del retorno venoso al corazón sin disminución
del volumen de sangre total

Asma
Neumotórax
Neumonía bacteriana o viral
Ventilación con presión positiva
Enfermedad obstructiva pulmonar crónica
Fallo del lado derecho del corazón
Trastornos de la columna vertebral o de los nervios
periféricos (síndrome de Guillain-Barré, poliomielitis)
Incremento de la secreción de HAD por el hipotálamo en
ausencia de un apropiado estímulo osmolar o de
volumen adecuado
Trastornos del sistema nervioso central (hemorragia
intracraneal, hidrocefalia, fractura de cráneo, asfixia
severa, tumores cerebrales, trombosis cerebrovascular,
meningitis, encefalitis, convulsiones, psicosis agudas y
atrofia cerebral)
Hipotiroidismo
Dolor, miedo
Estrés quirúrgico o por anestesia
Drogas tales como morfina, barbituratos, ciclofosfamida,
vincristina, y carbamazepina

Secreción autónoma y ectópica de HAD

Carcinoma broncogénico
Adenosarcoma del páncreas
Linfosarcoma
Adenocarcinoma duodenal
Tuberculosis pulmonar
Absceso pulmonar

Exceso de agua y sodio. La retención de agua y sodio generalmente produce la *expansión del compartimento extracelular*. Esto ocurre con insuficiencia renal oligúrica, síndrome nefrótico, insuficiencia cardíaca congestiva, cirrosis e hiperaldosteronismo primario. En estas condiciones el exceso de agua corporal total se asocia con una osmolaridad y sodio sérico normal o bajo (ver Tabla 24-4). La hipernatremia es rara con un exceso de agua. Si el sodio sérico es normal, el incremento en el ACT estará limitado al AEC. Con la hiponatremia el incremento del ACT estará compartido entre los compartimentos del AEC y del AIC.

Metabolismo de Sodio

Balance de sodio



En un adulto normal el sodio corporal total es alrededor de 55 mmol/kg de peso corporal; cerca del 30 % está fuertemente unido a la estructura cristalina del hueso y por lo tanto no es intercambiable. Así, sólo 40 mEq/kg es intercambiable entre los diversos compartimentos y es posible su medición. El sodio intercambiable se distribuye primariamente en el espacio intracelular (Fig. 24-9). Del 97 % al 98 % del sodio intercambiable se encuentra en el espacio del AEC y sólo de 2 % a 3 % en el espacio del AIC. Aproximadamente el 16 % del sodio intercambiable está en el plasma, 41 % está en el FI que se encuentra fácilmente accesible al compartimento del plasma, 17 % está en el FI del cartílago y el tejido conectivo denso, 20 % está en el FI del hueso y de 3 % a 4 % está en el compartimento del agua transcelular. El sodio total óseo (intercambiable y no intercambiable) representa entre el 40 % y el 45 % del sodio corporal total. Las concentraciones de sodio en los compartimentos de diferentes fluidos se muestran en la Tabla 24-2. Como se discutió previamente, la diferencia en la concentración de sodio entre el plasma y el FI es el resultado del equilibrio de Gibbs-Donnan. La diferencia en la concentración de sodio entre el FI y el AIC es el resultado del transporte activo de sodio por potasio hacia afuera de la célula.

La cantidad de sodio en el cuerpo es un reflejo del equilibrio entre la ingestión y la pérdida de sodio. La ingestión de sodio depende de la cantidad y tipo de alimento consumido. En condiciones normales el adulto promedio ingiere entre 50 y 200 mmol de sodio diario. La pérdida de sodio ocurre por tres vías primarias: el tracto gastrointestinal, la piel y la orina.

En circunstancias normales la pérdida de sodio a través del tracto gastrointestinal es muy pequeña. La excreción fecal de agua es sólo de 100 a 200 mL/día para un adulto normal y la excreción fecal de sodio es sólo de 1 a 2 mmol/día. Sin embargo, se debe considerar que aunque las pérdidas fecales de agua y electrolitos son normalmente pequeñas, el volumen total de fluido gastrointestinal secretado es grande, con un promedio de cerca de 8 L/día. Casi todo este volumen se reabsorbe normalmente. Sin embargo, cuando la reabsorción gastrointestinal está deteriorada, las pérdidas de agua y electrolitos son grandes. El volumen y el contenido de electrolitos de varias secreciones gastrointestinales se muestran en la Tabla 24-5. Se puede observar que la mayoría de las secreciones tienen contenidos de sodio mucho mayores que el de las heces. De esta forma, con diarrea severa o con tubos de drenaje gástrico o intestinal, las pérdidas de sodio a través del tracto gastrointestinal pueden exceder de 100 mmol/día.

El contenido promedio de sodio en el sudor es de alrededor de 50 mmol/día, pero es algo variable. La concentración de sodio en el sudor disminuye con la aldosterona y se incrementa en la fibrosis quística. La tasa de producción de sudor es altamente variable, aumentando en ambientes cálidos, durante el ejercicio y con la fiebre. En condiciones extremas, la producción de sudor puede exceder 5 L/día, ocasionando una pérdida de más de 250 mmol de sodio. En condiciones normales, en un ambiente fresco, las pérdidas de sodio por la piel son pequeñas. Con quemaduras extensas o lesiones exudativas de la piel, hay una gran pérdida de sodio y agua.

La principal vía de excreción de sodio es a través del riñón. Además, la excreción urinaria de sodio está regulada cuidadosamente para mantener la homeostasis corporal del sodio, la cual a su vez es crítica para controlar el volumen extracelular. Los detalles de los mecanismos y la regulación de la excreción de sodio renal se discuten en el capítulo 26.

El sodio se filtra libremente a través del glomérulo. Aproximadamente el 70 % del sodio filtrado se reabsorbe en el túbulo proximal, alrededor del 15 % en el asa de Henle,

alrededor de un 5 % en el túbulo distal, 5 % en el túbulo colector cortical y otro 5 % en el conducto colector medular; de esta forma, menos de un 1 % del sodio filtrado se excreta.

Trastornos del balance de sodio

Exceso de sodio.

El sodio se acumula en el cuerpo cuando el consumo de sodio excede la salida de sodio debido a alguna anormalidad de los mecanismos homeostáticos del sodio. Algunas de las principales causas clínicas de la retención de sodio aparecen en el cuadro abajo.

Ya que el sodio se distribuye en el espacio extracelular, un incremento del sodio corporal total se acompaña generalmente por un incremento en el volumen de AEC. Un aumento anormal en el volumen de AEC, particularmente un incremento en el espacio intersticial, produce una inflamación del tejido conocida como *edema*. Así, aquellas condiciones clínicas asociadas con la retención de sodio se caracterizan frecuentemente por la presencia de edema. Clínicamente, el edema se caracteriza por la inflamación y la hinchazón del cuerpo.

Insuficiencia cardíaca congestiva. Cuando el corazón comienza a fallar como bomba, ocurren una serie de mecanismos fisiopatológicos que conducen a la retención de sodio. El corazón insuficiente no bombea tanta sangre al riñón, lo cual resulta en menos filtración de sodio, mayor reabsorción y en consecuencia, menos excreción. El incremento de la presión de retorno venosa generada por el corazón insuficiente provoca que el fluido se mueva del espacio vascular al espacio intersticial, disminuyendo el volumen de plasma efectivo y el volumen de eyección cardíaco. Estos factores estimulan la secreción de angiotensina II, aldosterona y HAD, y disminuye la liberación del factor natriurético atrial. Estas respuestas hormonales aceleran la retención de sal y agua.

Trastornos hepáticos. En algunas enfermedades del hígado hay obstrucción venosa, la cual resulta en un incremento de la presión venosa portal y sinusoidal. Esto a su vez conduce a la salida de fluido del espacio vascular hacia el espacio peritoneal (ascitis), lo cual reduce el volumen de plasma efectivo. La disminución del volumen plasmático ocasiona retención de sal y agua por mecanismos similares a los descritos en la insuficiencia cardíaca.

Trastornos renales. Si el riñón se daña hasta un grado tal que la tasa de filtración glomerular se reduce considerablemente y la excreción de sodio está por lo tanto comprometida, se producirá retención de sodio (ver capítulo 26). La retención de sodio ocurre mediante otro mecanismo en el síndrome nefrótico. Este síndrome se caracteriza por la proteinuria y la disminución de los niveles séricos de albúmina, lo cual provoca una reducción de la presión osmótica coloidal plasmática y por lo tanto, un desplazamiento de fluido del espacio vascular al espacio del fluido intersticial. Esto a su vez produce una hipovolemia, con la consiguiente retención de sal y agua, como se discutió previamente.

Embarazo. Las causas para la acumulación de sodio durante el embarazo no están aún aclaradas, pero no hay dudas de que la mayoría de las mujeres acumulan entre 500 y 800 mmol de sodio durante un embarazo normal. Algunos sugieren que la acumulación de sodio puede ser un reajuste del mecanismo homeostático normal que regula el agua y el sodio corporales.



Condiciones Clínicas que Producen un Exceso de Sodio Corporal

Fallo cardíaco
Enfermedad hepática
Enfermedad renal - síndrome nefrótico
Hiperaldosteronismo
Embarazo

Deprivación de sodio.

El abatimiento de sodio ocurre cuando la salida de sodio excede a la ingesta (ver cuadro anterior). Tal como se discutió previamente, sólo pequeñas cantidades de sodio se pierden en las heces en condiciones normales. Sin embargo, en condiciones de diarrea severa o drenaje de las secreciones gastrointestinales, la excreción de sodio gastrointestinal puede ser muy grande. Si este no se reemplaza mediante la ingestión de sodio, se producirá la deprivación de sodio. Por otra parte, ya que la vía gastrointestinal puede no estar disponible, el reemplazo por vía intravenosa de agua y electrolitos puede ser necesario. De modo similar, las pérdidas de sodio a través de la piel son normalmente pequeñas. Sin embargo, cuando el volumen de sudor es grande, cuando la concentración de sodio en el sudor es anormalmente alta (como en la fibrosis quística), o cuando hay una pérdida anormal de fluido y electrolitos a través de la superficie corporal (como ocurre en las quemaduras extensas), la cantidad de sodio perdido a través de la piel puede ser sustancial y entonces puede ocurrir la deprivación de sodio.

Cuando los túbulos del riñón no son capaces de reabsorber el sodio debido a una enfermedad o a trastornos hormonales, la pérdida de sodio puede ser excesiva. Por ejemplo, la deficiencia de aldosterona, producida por enfermedad de la glándula adrenal o por trastornos en el sistema de regulación de la aldosterona, conduce a una disminución de la reabsorción de sodio en la nefrona distal y el agotamiento del sodio corporal total. La inhibición de la reabsorción de sodio tubular mediante un diurético también puede provocar la deprivación de sodio corporal.

En el síndrome de secreción inadecuada de la hormona antidiurética (ver pág. 450) hay retención de agua y expansión hipotónica de los espacios del AEC y del AIC. Esto a su vez inhibe la reabsorción de sodio en la nefrona proximal y también en la nefrona distal, provocando la deprivación de la sal corporal.

Condiciones Clínicas que Pueden Provocar Déficits de Sodio Corporal

Pérdidas gastrointestinales – vómitos, diarrea, fístulas, tubos de drenaje
Sudor excesivo – ejercicio, fiebre, ambiente cálido
Enfermedad renal
Insuficiencia adrenal – hipoaldosteronismo
Terapia diurética



Diuresis osmótica – diabetes mellitus
Quemaduras
Síndrome de secreción inadecuada de la hormona antidiurética

Anomalías de la concentración de sodio plasmático

Los cambios en el sodio corporal total no están necesariamente asociados con cambios similares en la concentración de sodio plasmático. Esto significa que, con la retención de sal, la concentración de sodio plasmático no se incrementa necesariamente. De hecho, el sodio plasmático está frecuentemente disminuido en estadios de retención de sodio. De modo similar, la privación de la sal no está obligatoriamente asociada con las concentraciones disminuidas de sodio plasmático. La concentración de sodio plasmático refleja los balances relativos del agua y el sodio extracelular.

La *hiponatremia* (bajo sodio sérico) ocurre cuando hay un mayor exceso de agua extracelular que de sodio o un mayor déficit de sodio que de agua. Algunas causas de hiponatremia se relacionan en el cuadro superior a la derecha. Obsérvese que en muchos casos hay un exceso de sodio corporal total.

Los síntomas de hiponatremia dependen de la causa, la magnitud y la tasa de reducción del sodio sérico. En casos de hiponatremia aguda debida a una intoxicación por agua, aparecen náuseas, vómitos, convulsiones y coma. Los síntomas son menos fulminantes con la hiponatremia crónica causada por el abatimiento de sal cuando ocurre una disminución de agua. En grados de severidad progresiva de hiponatremia crónica puede ocurrir sed constante, calambres musculares y abdominales, náuseas, vómitos, debilidad, letargo, y finalmente delirio y pérdida de la consciencia.

Condiciones Clínicas Asociadas con la Hiponatremia

Mayor exceso de agua que de sodio
Fallo cardíaco*
Enfermedad hepática*
Síndrome nefrótico*
Fallo renal*
Secreción inapropiada de HAD
Polidipsia psicogénica (ingestión excesiva de líquido)
Hiponatremia esencial (reset “osmostat”)
Mayor déficit de sodio que de agua
Algunas anomalías gastrointestinales – vómitos, diarrea, fístulas y obstrucción intestinal
Quemaduras
Terapia diurética
Insuficiencia adrenal - hipoaldosteronismo
Movimiento de sodio del espacio del agua extracelular al intracelular
Insuficiencia adrenal – hipoaldosteronismo
Síndrome de la célula enferma - shock
Pseudo hiponatremia – hiperglicemia, hiperlipidemia,



hiperglobulinemia

* La hiponatremia es dilucional, o sea, secundaria a la retención excesiva de agua. El sodio corporal total puede incluso incrementarse.

La *hipernatremia* (alto sodio plasmático) ocurre cuando hay mayor déficit de agua extracelular que de sodio. Un mayor exceso de sodio que de agua raramente ocurre. Las causas de hipernatremia se relacionan en el cuadro que aparece debajo. Obsérvese que en muchos casos hay en realidad un déficit de sodio corporal total.

La hipernatremia ocurre generalmente como un proceso crónico secundario a una pérdida de agua en exceso de sodio. Los síntomas son, por lo tanto, aquellos de la deshidratación (ver Métodos, Sodio y potasio, pág. 461)

Condiciones Clínicas Asociadas con la Hipernatremia

Mayor exceso de sodio que de agua
Ingestión de grandes cantidades de sodio
Administración de NaCl o NaHCO₃
Aldosteronismo primario
Mayor déficit de agua que de sodio
Sudor excesivo* - ejercicio, fiebre, ambiente cálido
Quemaduras*
Hiperventilación
Diabetes insípida
Deficiencia de HAD
Nefrogénica – no respuesta renal a la HAD
Diuresis osmótica* - diabetes, infusión de manitol
Disminución de la ingestión de líquido – disminución de la sed
Hipernatremia esencial – reset “osmostat”
Algunos estados de diarrea y vómitos*

* El sodio corporal total está disminuido. La concentración de sodio sérico se aumenta debido a que la magnitud de la pérdida de agua excede la magnitud de la pérdida de sodio.

Metabolismo del Potasio

Balance del potasio

Aproximadamente el 98 % del potasio corporal total se encuentra en el espacio del AIC, alcanzando una concentración allí de alrededor de 150 a 160 mmol/L. En el espacio del AEC, la concentración de potasio es sólo de 3,5 a 5 mmol/L. El potasio corporal total en un

adulto masculino es de alrededor de 50 mmol/kg de peso corporal y está influido por la edad, el sexo y, muy importante, por la masa muscular, ya que la mayoría del potasio corporal está contenido en el músculo.

Las concentraciones de potasio en los compartimentos de los diferentes fluidos se relacionan en la Tabla 24-2. La diferencia en la concentración de potasio entre el plasma y el fluido intersticial se atribuye al equilibrio de Gibbs-Donnan. La diferencia en la concentración de potasio en el FI y el fluido intracelular es el resultado del transporte activo de potasio hacia la célula a cambio del sodio. Los factores que aceleran el transporte de potasio dentro de la célula y por lo tanto incrementan la relación de potasio intracelular sobre el extracelular son la insulina, la aldosterona, la alcalosis y la estimulación β -adrenérgica. Entre los factores que reducen el transporte de potasio hacia la célula o aumentan su salida de la célula se encuentran la acidosis, la estimulación α -adrenérgica y la hipoxia tisular.

La cantidad de potasio en el organismo es un reflejo del balance entre la entrada y salida de potasio. La entrada de potasio depende de la cantidad y tipo de alimento ingerido. En condiciones normales el adulto promedio ingiere de 50 a 100 mmol de potasio/día, alrededor de la misma cantidad que de sodio. La salida de potasio se produce por tres vías principales: el tracto gastrointestinal, la piel y la orina.

En condiciones normales la pérdida de potasio a través del tracto gastrointestinal es muy pequeña, no mayor de 5 mmol/día para un adulto. La concentración de potasio en el sudor es menor que la de sodio, por lo que las pérdidas de potasio a través de la piel son usualmente bastante pequeñas.

La forma principal de excreción de potasio es a través del riñón. El riñón es capaz de regular la excreción de potasio para mantener la homeostasis corporal del potasio. Los detalles de los mecanismos de excreción del potasio se discuten en el capítulo 26.

Trastornos del balance de potasio

Exceso de potasio.

El potasio se acumula en el cuerpo cuando la entrada de potasio excede la salida debido a alguna anomalía de los mecanismos homeostáticos del potasio. Algunas de la principales condiciones que provocan la retención de potasio se presentan en el cuadro superior. Debe notarse que en la mayoría de las condiciones el riñón normal es capaz de excretar una gran cantidad de potasio, y una entrada grande de potasio produce retención de potasio sólo cuando la función renal está comprometida.

Causas de Retención de Potasio
Incremento del consumo de potasio
Dieta alta en potasio
Suplementación oral de potasio
Administración intravenosa de potasio
Penicilina potásica en altas dosis
Transfusión de sangre envejecida
Disminución de la excreción de potasio
Fallo renal
Hipoaldosteronismo – fallo adrenal
Diuréticos que bloquean la secreción de



potasio del túbulo distal: triamterene, amiloride, espironolactona Defectos primarios de la secreción de potasio en el túbulo renal

Abatimiento de potasio.

La deprivación de potasio ocurre cuando la salida de potasio sobrepasa la entrada. De acuerdo a lo discutido previamente, sólo pequeñas cantidades de potasio se pierden en las heces, en condiciones normales. Sin embargo, al igual que en el caso del agua y el sodio, la pérdida de potasio gastrointestinal durante la diarrea o el drenaje de secreciones gastrointestinales puede ser bastante grande (ver Tabla 24-5). Algunas de las principales condiciones clínicas que provocan la deprivación de potasio se presentan en el cuadro inferior.

Obsérvese que la alcalosis provoca la deprivación del potasio corporal total. Con alcalosis, el potasio se mueve del espacio extracelular al espacio intracelular. En las células de la nefrona distal del riñón, este incremento en el potasio intracelular estimula la secreción de potasio y por lo tanto aumenta la excreción renal de potasio.

Causas de la Deprivación de Potasio
Disminución de la ingestión de potasio
Dieta baja en potasio
Alcoholismo
Anorexia nerviosa
Incremento de las pérdidas gastrointestinales
Vómitos
Diarrea
Fístulas
Tubos de drenaje gastrointestinal
Malabsorción
Abuso de laxantes o enemas
Incremento de las pérdidas urinarias
Aumento de la aldosterona
Aldosteronismo primario
Hiperplasia adrenal
Síndrome de Bartter
Síndrome adrenogenital
Enfermedad renal
Acidosis tubular renal
Síndrome de Fanconi
Diuréticos
Tiazidas
Diuréticos cíclicos – ácido etacrínico, furosemida
Inhibidores de la anhidrasa carbónica
acetazolamida
Alcalosis

Anomalías de la concentración de potasio plasmático

Las anomalías en la concentración de potasio plasmático pueden ocurrir, no sólo por las alteraciones en el potasio corporal total, sino también debido a los cambios de potasio entre los compartimentos extracelular e intracelular. Aunque similares cambios ocurren con el sodio, el efecto del cambio de intracelular a extracelular en las concentraciones plasmáticas es más pronunciada para el potasio, ya que el 98 % del potasio total es intracelular. Por ejemplo, si sólo un 2 % del potasio intracelular se desviara al espacio extracelular, la concentración de potasio plasmático sería el doble. Afortunadamente, la concentración de potasio plasmático se mantiene bastante constante a pesar de las grandes fluctuaciones en la entrada de potasio. Este mecanismo homeostático aparece descrito en la Fig. 24-10 para un aumento en la entrada de potasio. El efecto opuesto ocurre con una disminución de la entrada de potasio.

Hiperpotasemia.

Las condiciones clínicas asociadas con la elevación del potasio plasmático se relacionan en el cuadro siguiente. El potasio plasmático puede estar normal, pero el potasio plasmático medido puede estar elevado si la muestra de sangre está hemolisada o si hay un escape de potasio de los leucocitos, cuando hay leucocitosis (número elevado de leucocitos). Además, el ejercicio fuerte de los brazos, la aplicación de un torniquete muy apretado, o apretar el área alrededor del sitio de punción de una vena, pueden ocasionar la liberación de potasio de la célula y una falsa elevación de la concentración de potasio plasmático.

La verdadera hiperpotasemia puede resultar del movimiento de potasio hacia fuera de la célula en el espacio del agua extracelular, del aumento de la entrada o de la disminución de la salida. La hiperpotasemia provocada por las desviaciones de potasio pueden estar asociadas de hecho con la deprivación total del potasio. Es el caso de la cetoacidosis diabética. La hiperpotasemia producida por un incremento de la entrada o la disminución de la salida se asocia con el exceso de potasio corporal total.

Los signos clínicos y síntomas de hiperpotasemia incluyen cambios en el electrocardiograma, arritmia cardíaca, debilidad muscular y parestesias. El mayor peligro de la hiperpotasemia es la amenaza para la vida que supone la arritmia cardíaca o la parada.

Causas de Hiperpotasemia
Pseudohiperpotasemia
Hemólisis
Leucocitosis
Cambio de intracelular a extracelular
Acidosis*
Daños por aplastamiento
Hipoxia tisular*
Deficiencia de insulina*
Sobredosis de digitálicos
Alta ingestión de potasio**
Disminución de la excreción de potasio**
* Puede estar asociado con la deprivación del potasio corporal total
** Ver cuadro superior p. 454

Hipopotasemia.

La concentración baja de potasio plasmático (hipopotasemia) puede ser provocada por el movimiento de potasio hacia dentro de la célula desde el espacio del agua extracelular, el incremento de la salida, o la disminución de la entrada (ver cuadro en la pág. 456). La hipopotasemia causada por las desviaciones de potasio pueden de hecho asociarse con el incremento del potasio corporal total. La hipopotasemia causada por el aumento de la excreción o la disminución de la entrada está asociada con la privación del potasio corporal total.

Los signos y síntomas de hipopotasemia son numerosos e incluyen anorexia, náuseas, vómitos, distensión abdominal, calambres o hipersensibilidad musculares, parestesias, alteraciones electrocardiográficas, arritmias, incapacidad para concentrar la orina con poliuria y polidipsia, letargo y confusión. Para los métodos de análisis véase sodio y potasio descritos previamente y la pág. 461.

Causas de Hipopotasemia
<p>Cambio de potasio extracelular a intracelular</p> <p>Alcalosis</p> <p>Aumento de la insulina plasmática*</p> <p>Administración de diuréticos</p> <p>Disminución de la ingestión de potasio**</p> <p>Incremento de las pérdidas gastrointestinales**</p> <p>Aumento de las pérdidas urinarias**</p>
<p>* Puede estar asociado con el exceso de potasio corporal total</p> <p>** Ver cuadro arriba (inferior, p.454)</p>

Metabolismo del Cloruro

Balance del cloruro

El cloruro es el principal anión en el espacio de AEC. En un adulto normal el cloruro corporal total es alrededor de 30 mmol/kg del peso corporal. Aproximadamente el 88 % del cloruro se encuentra en el espacio del AEC y el 12 % en el espacio del AIC. Cerca del 14 % del cloruro corporal total está en el plasma, 27 % en el FI que está accesible al plasma, 17 % en el FI del tejido conectivo denso y del cartílago, 15 % en el FI del hueso, y 5 % en el espacio transcelular. Las concentraciones de cloruro en los compartimentos de los diferentes fluidos se relacionan en la Tabla 24-2. Obsérvese que la concentración de cloruro en el FI es mayor que en el agua plasmática, mientras que las concentraciones de sodio y potasio en el FI son menores que en el agua plasmática. Estas diferencias entre el plasma y el FI son provocadas por el equilibrio de Gibbs-Donnan. El cloruro se distribuye pasivamente a través de la membrana. La diferencia en la concentración de cloruro entre el FI y el AIC es



producida por la diferencia del potencial eléctrico a través de la membrana celular. Debido a que el interior de la célula es negativa comparada con el exterior, la concentración de cloruro fuera de la célula será mayor que en el interior. La cantidad de cloruro en el cuerpo es un reflejo del balance entre el entrada y la salida del cloruro. La entrada de cloruro depende de la cantidad y tipo de alimento ingerido. El contenido de cloruro de la mayoría de los alimentos es semejante a la del sodio. En condiciones normales el adulto promedio ingiere de 50 a 200 mmol de cloruro/día. La salida de cloruro ocurre por tres rutas principales: el tracto gastrointestinal, la piel y el tracto urinario.

En circunstancias normales la pérdida de cloruro a través del tracto gastrointestinal es muy pequeña. La excreción de cloruro fecal de un adulto normal es sólo de 1 a 2 mmol/día. Las concentraciones de cloruro en las secreciones gastrointestinales se muestran en la Tabla 24-5. Con diarrea severa o con tubos de drenaje gástrico o intestinal la pérdida de cloruro a través del tracto gastrointestinal puede exceder los 100 mmol/día.

La composición promedio de cloruro en el sudor es de 40 mEq/L pero es algo variable. Como en el caso del sodio, la concentración de cloruro en sudor disminuye con la aldosterona y se incrementa en la fibrosis quística. En condiciones de excesivo sudor, las pérdidas de cloruro a través de la piel pueden sobrepasar los 200 mmol/día. Sin embargo, en condiciones normales las pérdidas de cloruro a través de la piel son pequeñas.

La principal vía de excreción de cloruro es a través del riñón. Los detalles de los mecanismos de excreción renal de cloruro se discuten en el capítulo 26.

Trastornos del balance de cloruro

Exceso de cloruro.

El cloruro se acumula en el cuerpo cuando la entrada de cloruro sobrepasa la salida debido a alguna anomalía del mecanismo de homeostasis del cloruro. Para la mayoría, las causas de la retención de cloruro son fundamentalmente las mismas que las de la retención de sodio. Por eso, la fisiopatología del exceso de cloruro es en la mayoría de los casos similar a la del exceso de sodio (ver el cuadro de la izquierda, pág. 452). Sin embargo, hay una condición clínica en la cual el exceso de cloruro puede no estar asociado con el exceso de sodio: algunos tipos de acidosis metabólica. Los dos principales aniones extracelulares son el cloruro y el bicarbonato. El bicarbonato extracelular se consume por la reacción con los iones hidrógeno producidos en la acidosis metabólica. Si no se producen aniones orgánicos con el H^+ , los iones cloruros serán necesarios para reemplazar los iones bicarbonato consumidos, para mantener la neutralidad eléctrica. El incremento en la concentración de cloruro es causado por la reabsorción de una proporción relativamente mayor de sodio con cloruro que con bicarbonato en los túbulos del riñón.

Abatimiento de cloruro.

La deprivación de cloruro ocurre cuando la salida de cloruro sobrepasa la entrada. Para la mayoría, las causas de la deprivación de cloruro son las mismas que las de la deprivación de sodio (ver cuadro a la derecha, pág. 452). Sin embargo, en una condición clínica, la alcalosis metabólica hipoclorémica, puede haber deprivación de cloruro sin deprivación de sodio. La alcalosis metabólica hipoclorémica puede ser el resultado de la pérdida de cloruro en exceso de una pérdida de sodio, generalmente debido a una pérdida anormal de fluido gástrico. El bicarbonato debe ser retenido para mantener la neutralidad

eléctrica. La hipocloremia puede también estar asociada con otros trastornos que involucran la retención de bicarbonato, tal como la compensación renal por la acidosis respiratoria crónica (ver capítulo 25).

Anomalías en la concentración de cloruro plasmático

Al igual que para el sodio, los cambios en el cloruro corporal total no están necesariamente asociados con cambios similares en la concentración de cloruro plasmático. Esto es, con la retención de cloruro corporal la concentración de cloruro plasmático permanecerá normal si hay un incremento proporcional en el AEC y disminuirá si hay un incremento relativamente mayor en el AEC. De igual modo, la concentración de cloruro plasmático puede permanecer normal o incluso incrementarse con la privación de cloruro, en dependencia del cambio concomitante en el AEC.

En la mayoría de los casos, las causas de hipocloremia y de hipercloremia son las mismas que las de la hiponatremia y la hipernatremia (ver pág. 453). Las principales excepciones clínicas a los habituales cambios paralelos en las concentraciones de sodio y cloruro plasmáticos ocurren durante la alcalosis y acidosis metabólicas crónicas. En la acidosis metabólica, la hipercloremia puede no estar asociada con la hipernatremia; en la alcalosis metabólica, la hipocloremia puede no estar asociada con la hiponatremia. Las razones para esto son las discutidas previamente para el exceso y la privación del cloruro.

Los síntomas no son directamente atribuibles a la hipocloremia o a la hipercloremia. Más bien, los síntomas que ocurren en los pacientes con una concentración anómala de cloruro sérico son motivados por la anomalía en el sodio sérico o el pH.

Un resumen de los cambios en los electrolitos plasmáticos durante la acidosis y la alcalosis metabólicas se presenta en la Fig. 24-11 (ver el método de cloruro en la pág. siguiente).

Métodos de Análisis

Hiato aniónico

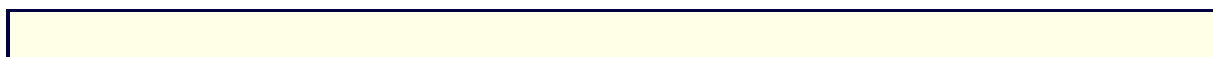
F. Phillip Anderson

W. Gregory Miller

Principios del análisis y uso corriente.

El hiato aniónico, comúnmente calculado como $\text{Na}^+ - (\text{Cl}^- + \text{CO}_2)$ es una estimación de la concentración de aquellos iones que no se miden normalmente en el suero. Debido a que la suma de todos los cationes debe ser igual a la suma de todos los aniones para mantener la neutralidad eléctrica dentro de la sangre, no hay un verdadero hiato aniónico. El hiato aniónico es la diferencia entre los cationes que generalmente no se miden y los aniones que generalmente no se miden, como siguiente:^{ref(479)}

Cationes no medidos	mEq/L
Calcio	5
Magnesio	2
Potasio	4
TOTAL	11



Aniones no medidos	mEq/L
Proteína	15
Fosfato	2
Sulfato	1
Ácidos orgánicos	5
TOTAL	23

HIATO ANIÓNICO 12

El hiato aniónico se utiliza clínicamente para detectar la presencia potencial de trastornos metabólicos que afectan el balance electrolítico. La Tabla 24-6 presenta una lista de estados patológicos asociados con el incremento o disminución del hiato aniónico. Debe notarse, sin embargo, que el uso del hiato aniónico sufre de pobre exactitud diagnóstica, y la confianza en el valor del hiato aniónico puede originar una mala interpretación de la condición actual del paciente. El hiato aniónico no es un sustituto para la determinación de los electrolitos, el pH sanguíneo, el lactato y otros datos pertinentes para el manejo del paciente. [ref\(480\)](#)

Intervalo de referencia.

Los estudios originales que establecieron el intervalo usual del hiato aniónico medían el sodio mediante fotometría de llama, el cloruro por el ensayo colorimétrico de tiocianato-nitrato mercurico y el CO₂ total por valoración de acidificación colorimétrica. Actualmente la mayoría de los laboratorios miden el sodio, el potasio y el cloruro utilizando electrodos de ion selectivo. Cuando se utiliza esta tecnología, las concentraciones de cloruro tienden a ser sobrestimadas sistemáticamente y la concentración de sodio subestimada, cuando se compara con los métodos antiguos utilizados para cuantificar estos componentes. [refs\(481\)](#)

Debido a que el hiato aniónico se calcula como Na^+ , o $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$, - $(\text{Cl}^- + \text{HCO}_3^-)$, esto trae como consecuencia un hiato aniónico consistentemente menor que el presentado anteriormente. Con los nuevos métodos para medir los electrolitos, el hiato aniónico estimado es a menudo ≤ 6 mEq/L y casi siempre ≤ 11 mEq/L. [ref\(482\)](#) Estos valores contrastan marcadamente con el intervalo de referencia de 8 a 16 mEq/L del hiato aniónico “tradicional”. [refs\(483\)](#) Idealmente, para que tenga utilidad clínica, cada laboratorio debe establecer el hiato aniónico basado en las metodologías que utilice para medir sodio, cloruro y bicarbonato.

Cloruro

W. Gregory Miller

F. Phillip Anderson

Principios del análisis.

Los primeros métodos para cuantificar cloruro hicieron uso de la baja solubilidad del cloruro cuando se combinaba con plata o mercurio para formar las sales de cloruro de plata o cloruro de mercurio. [ref\(484\)](#)

Los ensayos de cloruro disponibles actualmente para el uso en la rutina del laboratorio

clínico se encuentran en tres categorías: colorimetría, titulación coulométrica y electrodos de ion selectivo. Un método colorimétrico común para medir cloruro utiliza la capacidad del cloruro de desplazar al tiocianato del tiocianato de mercurio (Tabla 24-7, método 1).^{ref(485)} El tiocianato desplazado reacciona con el hierro férrico, presente también en la mezcla de reacción, para formar un complejo de tiocianato férrico de color rojo que puede ser medido colorimétricamente a 525 nm. Las fluctuaciones de temperatura afectan negativamente a esta técnica, por lo que se requiere que se mantenga la temperatura constante para obtener resultados exactos. La bilirrubina, la hemoglobina y la lipemia pueden interferir también en el análisis. Sin embargo, los efectos de estos componentes que interfieren pueden reducirse significativamente si se usa una relación de volumen de muestra a volumen de reactivo pequeña, tal como 0.01 mL de suero a 1 mL de reactivo.

Otro método habitual utilizado para cuantificar concentraciones de cloruro es la titulación coulométrica (Tabla 24-7, método 2).^{ref(486)} Los principios en los que se basan las titulaciones coulométricas tienen mucho en común con las valoraciones clásicas, a excepción de que la coulometría hace uso de un agente para titular generado electroquímicamente. La muestra se coloca en una solución que contiene un soporte electrolítico y se aplica un voltaje a los electrodos inmersos en la solución. El voltaje causa una reacción electrolítica en cada uno de los electrodos. Una de las reacciones en el electrodo genera iones plata, los cuales reaccionan con el cloruro en la muestra para producir cloruro de plata insoluble. El punto final de la titulación se detecta amperométricamente, mediante un segundo par de electrodos, como el súbito incremento en iones plata libre, lo cual ocurre cuando todos los iones cloruros se han consumido. El número de equivalentes de iones plata requeridos para titular los iones cloruro en solución puede calcularse a partir del número de coulombs (corriente x tiempo) producidos y la constante de Faraday (96,487 coulombs/equivalente). Sin embargo, en la práctica, se mide el tiempo requerido para titular una solución estándar de cloruro o una muestra desconocida. La concentración de cloruro en la solución desconocida se calcula por una proporción directa con respecto al tiempo requerido para titular una solución estándar de cloruro. La titulación coulométrica se acepta como el método de referencia para cloruro.

La precisión de la titulación coulométrica está limitada por la tasa de transferencia de masa de los iones plata en el electrodo generador dentro de la mezcla de la muestra. El tiempo necesario para detectar el punto final una vez que todo el cloruro se consume se llama el “tiempo blanco” y depende de la rapidez de mezclado en el vaso y en la tasa de formación de plata. El tiempo blanco debe ser una pequeña fracción del tiempo total de titulación para obtener una máxima precisión. Los electrodos sucios provocarán una pobre reproducibilidad de los resultados. Se ha recomendado^{ref(487)} lavar los electrodos con soluciones de hidróxido de amonio y ácido nítrico entre cada titulación. La adición de gelatina, usada en la técnica original, o alcohol polivinílico, que es más estable, en los procedimientos actuales previene la reducción de cloruro de plata en los electrodos indicadores y promueve la deposición uniforme de los iones plata en exceso en el cátodo indicador. Esto resulta en una corriente amperométrica plana y una detección del punto final reproducible. Es necesario que la mezcla de reacción tenga un pH ácido para prevenir la formación de sales básicas de plata poco solubles. Un pH ácido de la mezcla de reacción proporciona conductividad iónica y hace más pronunciado el punto final al reducir la escasa solubilidad del cloruro de plata.^{ref(488)}

El método que se usa con más frecuencia hoy para medir las concentraciones de cloruro es el método basado en el ion selectivo (Tabla 24-7, método 3). Las limitaciones de



esta tecnología son esencialmente las mismas que las descritas para el sodio y el potasio. El elemento sensor del ion selectivo es generalmente plata/cloruro de plata o sulfuro de plata. Las determinaciones de cloruro utilizando electrodos de ion selectivo pueden realizarse en muestras diluidas o sin diluir.

Otra técnica para el análisis de cloruro que ha sido descrita recientemente está basada en la determinación de la actividad de la amilasa cloruro dependiente (Tabla 24-7, método 4). [ref\(489\)](#) La amilasa, la cual requiere iones calcio para su actividad, se desactiva mediante la retirada del ion calcio con un agente quelante (esto es, ácido etilendiaminotetracético o EDTA) en ausencia del ion cloruro. La α -amilasa desactivada se reactiva mediante la adición de un espécimen que contenga cloruro. El ion cloruro en la muestra permite que el calcio se reasocie con la α -amilasa causando la reactivación de la enzima. La cantidad de enzima que se reactiva es proporcional a la concentración de cloruro en la muestra. La α -amilasa reactivada se pone en contacto con un sustrato sintético que libera 2-cloro-4-nitrofenol, el cual puede ser detectado a 405 nm con un espectrofotómetro. Este ensayo para cloruro sérico basado en la enzima, aunque es aplicable generalmente a un amplio rango de analizadores automatizados de química, no está en uso actualmente.

Todos los métodos de análisis de cloruro muestran una interferencia positiva con otros haluros. La única interferencia con haluros clínicamente importante es con el bromuro, el cual se suministra en algunas preparaciones farmacéuticas. Aunque el bromuro interfiere con todos los ensayos de cloruro, se ha reportado que el método de electrodos de ion selectivo es el más vulnerable a la interferencia por bromuro. [ref\(490\)](#) Aun cuando pueden obtenerse erróneamente altos valores de cloruro al analizar muestras que contienen bromuro, el laboratorio puede tener la oportunidad de mejorar la atención del paciente identificando la toxicidad por bromuro.

Especimen.

Las determinaciones de cloruro pueden realizarse en suero, plasma heparinizado, orina y otros fluidos corporales. Algunos analizadores no selectivos pueden medir concentraciones de cloruro en sangre total. El suero debe ser separado rápidamente de los eritrocitos porque los cambios en el pH de la muestra alterarán la distribución de cloruro entre las células y el suero. El cloruro en las muestras venosas es aproximadamente de 3 a 4 mmol/L menor que en las muestras arteriales.

Intervalo de referencia.

El intervalo de referencia para el cloruro en suero o plasma es de 98 a 107 mmol/L. El cloruro en orina de adultos sanos es de 110 a 250 mmol/L, sin embargo los valores pueden variar grandemente en dependencia de la ingestión de cloruro.

Osmolalidad

Steven C. Kazmierczak

Lawrence A. Kaplan

Principios del análisis y uso actual.

La osmolalidad es una propiedad coligativa de las soluciones, que depende del número de moléculas de solutos presente en un volumen dado de solución. Las características físicas



del soluto, tales como el tamaño de las partículas, el peso molecular, o la composición química, no ejercen ningún efecto en las propiedades coligativas de una solución, sólo el número de partículas presente en la solución es responsable de los efectos coligativos (ver Capítulo 14 para una discusión más amplia). En la medida que el número de partículas disueltas en una solución *aumenta*, los cambios coligativos que ocurren en la solución incluyen una *disminución* en el punto de congelación y la presión de vapor y un incremento en la presión osmótica y el punto de ebullición. [ref\(491\)](#) Los tres tipos de solutos más frecuentemente encontrados en los fluidos biológicos son los electrolitos, las moléculas orgánicas y los coloides. Es importante entender que no es la concentración de masa sino la concentración molar, o sea, los moles por kilogramo de solvente, lo que constituye la base de las propiedades coligativas. Por ejemplo, la concentración de sales y compuestos orgánicos de bajo peso molecular en los fluidos biológicos, tales como la glucosa y la urea afectan la osmolalidad mucho más que la albúmina, la cual está presente en una gran cantidad de masa pero en una menor concentración molar. Así, la concentración de NaCl sérico de 9 g/L equivale aproximadamente a una concentración molar de 150 mmol/L. La concentración molal de albúmina sérica, cuando la albúmina se encuentra en 40 g/L, es de aproximadamente de 0.58 mmol/L.

Las determinaciones de osmolalidad en el laboratorio clínico se realizan generalmente en muestras de suero u orina. Estos fluidos habitualmente tienen una osmolalidad entre 200 y 1 200 mmol/kg (mOsm). La relación entre la osmolalidad del suero o la orina y la molalidad de las sustancias presente en estos fluidos está cercana a la linealidad en este rango. Así, un cambio medido en la osmolalidad de estos fluidos será proporcional al cambio en la concentración molar de uno o más componentes presentes en la solución.

En principio, la medición de cualquiera de las propiedades coligativas podría ser usada para calcular la osmolalidad de una solución. En la práctica, las propiedades coligativas utilizadas para cuantificar la osmolalidad del fluido son la disminución del punto de congelación y la disminución de la presión de vapor. La medición de la propiedad coligativa que con más frecuencia se utiliza para medir la osmolalidad de un fluido es la disminución del punto de congelación. Cuando se adiciona 1 mol de un soluto que no se disocia a 1 kg de agua, el punto de congelación disminuye en 1.858° C. La adición de 1 mol de un componente que se disocia tal como NaCl, a 1 kg de agua haría disminuir el punto de congelación en 3.716° C (1.858° C/mol x 2) debido a que 1 mol de NaCl se disociaría para formar 1 mol de Na⁺ y un mol de Cl⁻.

Se puede medir el punto de congelación de la muestra enfriando rápidamente la solución por debajo de su punto de congelación. La congelación efectiva de una solución se inicia mediante movimiento mecánico o vibración. La temperatura de la solución se controla a través de todo este proceso utilizando una resistencia térmica sensible. A medida que la solución comienza a congelarse, se libera energía en forma de calor se libera por la fusión de los cristales de hielo. A medida que la solución se calienta, la temperatura alcanza una meseta donde la solución congelada (hielo) está en equilibrio con la solución que está aún sin congelar. Esta temperatura registrada en esta meseta es el punto de congelación de la solución. El valor de temperatura se convierte a la osmolalidad de la solución mediante la comparación con los factores de calibración que se derivan de la medición del punto de congelación realizada en soluciones de osmolalidad conocida.



Una medición de propiedad coligativa utilizada menos frecuentemente para cuantificar la osmolalidad de un fluido es la disminución de la presión de vapor. El osmómetro de presión de vapor no mide realmente la presión de vapor sino que en su lugar mide la temperatura del punto de condensación o saturación del vapor. El punto de condensación es la temperatura a la cual el aire está saturado con el vapor del solvente, que está en equilibrio con el solvente en la fase líquida.^{ref(492)} Cuanto mayor sea la cantidad de partículas disueltas presentes en la solución (aumento de la osmolalidad), menor es la presión de vapor del componente acuoso de la solución. Una excepción importante de esta regla ocurre cuando el soluto por sí mismo es una sustancia volátil. Entre los ejemplos de componentes volátiles encontrados con frecuencia se incluyen el etanol, el metanol, el isopropanol y el etilenglicol. Una desventaja importante de los osmómetros de presión de vapor es que ellos no detectan estos solutos volátiles. Los solutos volátiles contribuyen a la presión de vapor total presente encima de la solución, aunque ellos disminuyen la presión de vapor de la porción de agua de la solución. Así, la disminución de la presión de vapor de agua está contraequilibrada por el incremento en la presión de vapor provocada por la presencia de una sustancia volátil. Sin embargo, a medida que la concentración de la sustancia volátil aumenta en las soluciones acuosas, la presión de vapor encima de la solución se incrementa realmente, lo cual arroja falsos valores bajos de osmolalidad.

Un procedimiento rápido utilizado frecuentemente para estimar la osmolalidad del suero o el plasma consiste en sumar las concentraciones molares de los solutos que tienen principios activos osmolares presentes en los mencionados fluidos.^{ref(493)} Se han propuesto varias fórmulas para calcular la osmolalidad del suero; la más simple y más frecuentemente usada es la siguiente:

$$\text{Calculo mOsm/L H}_2\text{O} = 1.86 [\text{Na}^+] + \frac{\text{Glucosa (mg/L)}}{180 \text{ mg/mmol}} + \frac{\text{BUN (mg/L)}}{28 \text{ mg/mmol}} \quad \text{Ec. 24-216}$$

donde las concentraciones de sodio se expresan en milimoles por litro (mmol/L), y las concentraciones de glucosa y nitrógeno ureico sanguíneo (BUN) se dividen por sus respectivos pesos moleculares, 180 y 28, para convertir estas concentraciones de masa en milimoles por litro (mmol/L).^{ref(494)} Entre otras fórmulas también se incluyen las dos siguientes:

$$\text{Calculo mOsm/L H}_2\text{O} = 1.86 [\text{Na}^+] + \frac{\text{Glucosa (mg/L)}}{180 \text{ mg/mmol}} + \frac{\text{BUN (mg/L)}}{28 \text{ mg/mmol}} + 9 \quad \text{Ec.24-317}$$

$$\text{Calculo mOsm/L H}_2\text{O} = 2 [\text{Na}^+] + \frac{\text{Glucosa (mg/L)}}{200} + \frac{\text{BUN (mg/L)}}{30} \quad \text{Ec.24-415}$$

Estas fórmulas están diseñadas para alcanzar un balance entre la simplicidad y facilidad de los cálculos y el objetivo de obtener resultados muy semejantes a los que se obtendrían al medir la osmolalidad. Es importante notar que aunque la osmolalidad debe expresarse como



miliosmoles por kilogramo (mOsm/kg) de agua, con mucha frecuencia se calcula y expresa como miliosmoles por litro (mOsm/L) de agua. El pequeño error introducido tiene poca significación clínica.^{ref(495)} La diferencia entre la osmolalidad sérica medida y calculada, el “hiato de osmolalidad” ha sido sugerido como un ensayo rápido para la detección de sustancias volátiles ingeridas, especialmente alcoholes.^{ref(496)} Hay una muy buena correlación entre la concentración de alcohol medida enzimáticamente y la determinación mediante cálculo.^{ref(497)}

Especimen.

La obtención de sangre sin anticoagulante es el espécimen preferido. El suero debe ser extraído de las células sanguíneas coaguladas tan rápido como sea posible. La orina u otros fluidos corporales son también aceptables, garantizando que han sido bien centrifugados para extraer los restos de células. Las muestras aleatorias de orina pueden variar considerablemente en la concentración de componentes y por ello pocas veces tienen utilidad clínica. El espécimen preferido para la medición de la osmolalidad urinaria es una alícuota de una toma de orina de 24 horas.

Cualquier fluido que se deje descubierto tendrá una osmolalidad aumentada debido a la evaporación y la concentración de muestras de solutos. La osmolalidad sérica es estable durante 3 horas a temperatura ambiente y hasta 3 días a 4° C.^{ref(498)} La osmolalidad urinaria puede ser estable a 4° C hasta 24 horas^{ref(499)} y varias semanas si se congela el espécimen.

Intervalo de referencia.

SUERO. Los intervalos de referencia reportados para la osmolalidad sérica oscilan típicamente entre 282 y 300 mOsm/kg. No se han encontrado diferencias relacionadas con el sexo ni la edad para la osmolalidad sérica.

ORINA. La osmolalidad urinaria variará considerablemente con la dieta. Las osmolalidades de 24 horas variarán entre 50 y 1200 mOsm/24 horas.

LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO. El líquido cefalorraquídeo y otros fluidos corporales normales tendrán una osmolalidad que es esencialmente igual a la del suero extraído al mismo tiempo.

Sodio y Potasio

William J. Korzun

W. Gregory Miller

Principios de análisis y uso actual.

El método más común utilizado en la actualidad para la cuantificación de sodio y potasio es la potenciometría por electrodo ion selectivo (ISE). Sólo un pequeño porcentaje de los laboratorios utiliza la espectroscopía de emisión atómica por llama (EEAL). También han sido descritos métodos espectrofotométricos para el sodio y el potasio basados en la interacción del sodio o el potasio con ionóforos macrocíclicos cromogénicos que son capaces de acomplejar selectivamente al componente de interés.

El método de EEAL (Tabla 24-8, método 1) tiene un amplio rango de aplicaciones clínicas para la cuantificación de los metales alcalinos, incluyendo el sodio, el potasio y el litio.



El capítulo 4 describe los principios de la EEAL. Brevemente, cuando una muestra que contiene sodio o cloruro se aspira dentro de una llama de propano, se forman finas gólicas de solución. El calor de la llama de propano (alrededor de 1925° C) evapora el solvente dejando las partículas de sal de sodio y potasio dispersas en la llama. El calor transforma las partículas de sal en iones gaseosos de sodio y potasio. Estos iones captan electrones de los gases reductores presentes en la llama para formar los átomos en estado basal de Na^0 y K^0 . Una pequeña proporción de estos átomos en estado basal absorbe suficiente energía para alcanzar un estado energético mayor, o excitado, Na^* y K^* . Después de 10^{-13} segundos los iones excitados emiten nuevamente esta energía ganada como un fotón de luz. La emisión de sodio es generalmente detectada a 589 nm, el potasio a 766 nm el litio a 671 nm y el cesio (utilizado como un estándar interno) a 852 nm. La cantidad de luz emitida es directamente proporcional a la concentración de estos metales. Aunque sólo de 1 % a 5 % de los átomos en la llama son excitados hasta la emisión, esto es suficiente para cuantificar de forma exacta y precisa estos elementos.

Los métodos de EEAL utilizan habitualmente una dilución de la muestra de 1:100 ó 1:200 con un diluyente que contiene litio o cesio como estándar interno. De esta forma, el método para sodio y potasio es un método indirecto (ver texto a continuación) debido a que la predilución de la muestra ocurre antes del análisis. El uso de un estándar interno minimiza los errores de medición (ver capítulo 23).

La medición de sodio y potasio con métodos de ISE emplean membranas de intercambio iónico de vidrio para el sodio y membranas de intercambio iónico líquidas que incorporan valinomicina para el potasio. Las Figs. 24-12 y 24-13 son esquemas de electrodos selectivos de sodio y potasio. Los electrodos de sodio típicos tienen una selectividad mil veces mayor por el Na^+ que por el K^+ y son insensibles a un pH por encima de 1. Aunque la relación Na^+/K^+ en suero es aproximadamente 30, el electrodo de potasio tiene una adecuada selectividad, de modo que el sodio no interfiere.

Hay dos tipos generales de mediciones de ISE en muestras clínicas, la “directa” y la “indirecta”. Los sistemas potenciométricos directos miden la actividad del ion en una muestra sin diluir, mientras que los sistemas ISE indirectos miden la actividad del ion en una muestra prediluida. Existen diferencias significativas en las concentraciones de sodio cuando se miden por métodos directos o indirectos, especialmente para algunas condiciones fisiopatológicas. Pueden encontrarse falsos valores bajos de sodio en muestras que tienen elevadas concentraciones de lípidos o proteínas cuando se utilizan métodos ISE indirectos.^{ref(500)} Las razones para la obtención de estos valores bajos en estas condiciones es la disminución en el porcentaje de agua (contenido de agua) en el plasma; el sodio se disuelve sólo en la porción de agua del suero. Una disminución en el porcentaje de agua de la muestra significa menos sodio presente en un volumen dado de muestra; el resto de la muestra puede ser proteína o lípidos, aún así, la concentración de sodio presente en la fase acuosa puede permanecer inalterada.

Cuando la interferencia es causada por lipemia, se puede utilizar una ultracentrífuga para extraer el volumen de lípido en exceso de la muestra para alcanzar un resultado que tenga una significación fisiológica. Si la interferencia es provocada por proteínas, los métodos indirectos de ISE no son apropiados y debe utilizarse un método ISE “directo” para obtener un resultado clínicamente confiable. En pacientes con hiperproteinemia resultante de condiciones tales como un mieloma múltiple, los valores bajos de sodio pueden ser producidos también por la naturaleza catiónica de alguna de las paraproteínas o de errores en el muestreo



debido a la alta viscosidad del suero. [ref\(501\)](#)

El efecto de la hiperlipidemia o la hiperproteinemia no provoca habitualmente problemas de interpretación clínica en el caso del potasio debido a que el intervalo de referencia para el potasio es bastante grande con respecto a la magnitud de la concentración del potasio en el suero. Para el potasio la medida del intervalo de referencia (3.6 a 5.0 mmol/L) representa un 33 % de variación en la concentración mientras que para el sodio el intervalo de referencia (135 a 145 mmol/L) representa sólo un 7 % de variación en la concentración.

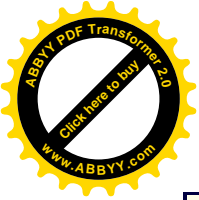
Recientemente se han desarrollado métodos espectrofotométricos para el sodio y el potasio basados en el uso de iónóforos macrocíclicos cromogénicos. Los iónóforos cromogénicos son nuevas estructuras moleculares capaces de acomplejar selectivamente a los cationes metálicos alcalinos, una propiedad atribuible sólo a ciertos compuestos naturales tales como la molécula potasio selectiva de valinomicina. La especificidad y selectividad de la unión iónica depende en gran medida del tamaño y la estabilidad de la estructura tridimensional de la molécula del iónóforo cíclico orgánico. Un tipo de reacción de acomplejamiento extrae de forma específica el K^+ en una fase orgánica que contiene al iónóforo. El complejo cargado K^+ -iónóforo interviene en la protonación de una molécula de colorante en fase orgánica con un posterior cambio espectral que es proporcional a la concentración de K^+ . [ref\(502\)](#) Una extracción en fase orgánica similar utilizando valinomicina y un indicador de pH se usa para medir potasio en un formato de tira seca. Una tercera alternativa para el K^+ y el Na^+ emplea un iónóforo soluble en agua que se une covalentemente a un colorante indicador ácido-base. El acomplejamiento a pH constante produce un cambio en el pKa del colorante que provoca un cambio en la absorbencia espectral proporcional a la concentración del ion. [ref\(503\)](#)

Se han reportado métodos enzimáticos para el sodio y el potasio que pueden adaptarse a los analizadores rutinarios de los laboratorios. Se han descrito ensayos cinéticos para el sodio, basado en la medida de la actividad de la β -galactosidasa sodio dependiente (EC 3.2.1.23), [ref\(504\)](#) y otro para el potasio basado en la actividad de la piruvato cinasa (EC 2.7.1.40). [ref\(505\)](#)

Especimen.

Suero, plasma heparinizado o sangre total, orina y otros fluidos corporales son especímenes aceptables. Las concentraciones de potasio en plasma pueden ser de 0.1 a 0.2 mmol/L menores que aquellas en el suero debido a la liberación de potasio por las plaquetas durante el proceso de la coagulación. El plasma heparinizado en el cual la heparina está presente como sal sódica es inaceptable para análisis de sodio a menos que el tubo esté completamente lleno de sangre. La heparina amoniacal es inaceptable cuando se utilizan métodos de electrodo ion selectivo o cromogénicos debido a que los iones amonio en altas concentraciones provocan falsos valores altos.

La hemólisis debe evitarse de modo estricto cuando se está midiendo potasio debido a que la menor lisis de las células rojas puede incrementar significativamente la concentración de potasio de la muestra. Los eritrocitos contienen mínimas cantidades de sodio, en comparación con el sodio plasmático, de modo que la hemólisis no afecta la concentración de sodio medida a menos que se trate de una hemólisis severa, donde por efecto de dilución se produzca una disminución de las concentraciones de sodio medidas. El suero, el plasma y otros fluidos deben ser separados de las células dentro de las 3 horas de obtenidos. El sodio y el potasio del



suero y del plasma son estables por una semana al menos a temperatura ambiente o en refrigeración y por un año como mínimo, congelados.

Intervalo de referencia.

Sodio	135 - 145 mmol/L
Potasio	3.6 - 5.0 mmol/L

Estos intervalos fueron obtenidos utilizando métodos indirectos de EEAL o EIS. Cuando se miden por métodos directos de EEAL o EIS estos intervalos serán algo mayores que cuando se miden mediante técnicas indirectas. Como se señaló anteriormente, los valores de potasio plasmático pueden ser de 0.1 a 0.2 mmol/L menores que los correspondientes valores séricos.

Referencias

1. Goldstein RJ, Lichtenstein NS, Souder S: The myth of the low anion hiato, *JAMA* 243:1737-1738, 1980.
2. Natelson S: On the significance of the expression "anion hiato," *Clin Chem* 29:282-283, 1983.
3. Berger R: Anion hiato: low sensitivity or erroneous reference range? *Crit Care Med* 19:129-130, 1991.
4. Cembrowski GS, Westgard JO, Kurtczyk DFI: Use of anion hiato for the quality control of electrolyte analyzers, *Am J Clin Pathol* 79:688, 1983.
5. Bockelman HW, Cembrowski GS, Kurtczyk DFI, et al: Quality control of electrolyte analyzers: evaluation of the anion hiato average, *Am J Clin Pathol* 81:219, 1984.
6. Winter SD, Pearson JR, Gabow PA, et al: The fall of the serum anion hiato, *Arch Intern Med* 150:311, 1990.
7. Emmett ME, Narins RG: Clinical use of the anion hiato, *Medicine* 56:38-54, 1977.
8. Oh MS, Carroll WJ: Current concepts: anion hiato, *N Engl J Med* 297:814-817, 1977.
9. Mather A: Chloride, direct mercurimetric titration (provisional). En Faulkner WR, Meites S, editores: *Selected methods of clinical chemistry*, Washington, D.C., 1982, American Association for Clinical Chemistry, vol 9, págs. 153-155.
10. Levinson SS: Chloride, colorimetric method. En Faulkner WR, Meites S, editores: *Selected methods of clinical chemistry*, Washington, D.C., 1982, American Association for Clinical Chemistry, vol 9, págs. 143-148.
11. Dietz AA, Bond EE: Chloride, coulometric-amperometric methods. En Faulkner WR, Meites S, editores: *Selected methods of clinical chemistry*, Washington, D.C., 1982, American Association for Clinical Chemistry, vol 9, págs. 149-52.
12. Ono T, Taniguchi J, Mitsumaki H, et al: A new enzymatic assay of chloride in serum, *Clin Chem* 34:552-553, 1988.
13. Emancipator K, Kroll MH: Bromide interference: Is less really better? *Clin Chem* 36:1470-1473, 1990.
14. Kayne FJ: Osmolality: review of methods, American Society of Clinical Pathologists, Check Sample, vol 9, no 7, Chicago, 1993; PTS 93-7 (PTS-73).
15. Weisberg HF: Osmolality-calculated "delta" and more formulas, *Clin Chem* 21:1182-1184, 1975.
16. Holmes JH: Measurement of osmolality in serum urine and other biologic fluids by the freezing point determination. In preworkshop manual on *Urinalysis of renal function studies*, Chicago, 1962, American Society of Clinical Pathologists, Commission on Continuing Education.
17. Dorwart WV, Chalmers L: Comparison of methods for calculating serum osmolality from chemical



- concentrations, and the prognostic value of such calculations, *Clin Chem* 21:190-194, 1975.
18. Bhagat CI, Garcia-Webb P, Fletcher E, Beilby JP: Calculated vs. measured plasma osmolalities revisited, *Clin Chem* 30:1703-1705, 1985.
 19. Loeb JN: The hyperosmolar state, *N Engl J Med* 290:1184-1187, 1974.
 20. Weissman N, Pilegg VJ: Inorganic ions. In Henry RJ, Cannon DC, Winkelman JW, editors: *Clinical chemistry principles and techniques*, New York, 1974, Harper & Row.
 21. Ladenson JH, Apple FS, Aguanno JJ, Koch DD. Sodium measurements in multiple myeloma: two techniques compared, *Clin Chem* 28:2383-2386, 1982.
 22. Sumiyoshih H, Nakahara K, Ueno K: New convenient colorimetric determination of potassium in blood serum, *Talanta* 24:763-765, 1977.
 23. Kumar A, Chapoteau E, Czech BP, et al: Chromogenic ionophore-based methods for spectrophotometric assay of sodium and potassium in serum and plasma, *Clin Chem* 34:1709-1712, 1988.
 24. Berry MN, Mazzachi RD, Pejakovic M, Peake MJ: Enzymatic determination of sodium in serum, *Clin Chem* 34:2295-2298, 1988.
 25. Berry MN, Mazzachi RD, Pejakovic M, Peake MJ: Enzymatic determination of potassium in serum, *Clin Chem* 35:817-820, 1989.

Bibliografia

- Atlas SA: Atrial natriuretic factor: renal and systemic effects, *Hosp Pract* 21(7):67, 1986.
- Badrick T, Hickman PE: The anion hiato-a reappraisal, *Am J Clin Pathol* 98:249-252, 1992.
- Cohen JJ: Disorders of potassium balance, *Hosp Pract* 14(1):119, 1979.
- Collins RD: *Illustrated manual of fluid and electrolyte disorders*, Philadelphia, 1983, Lippincott.
- Hays RM: Antidiuretic hormone, *N Engl J Med* 295:659, 1976.
- Inagami T: Atrial natriuretic factor as a volume regulator, *J Clin Pharmacol* 34:424, 1994.
- Kokko JP, Tannen RL: *Fluids and electrolytes*, Philadelphia, 1986, Saunders.
- Levey M: The pathophysiology of sodium balance, *Hosp Pract* 13:95, 1978.
- Lolekha PH, Lolekha S: Value of the anion hiato in clinical diagnosis and laboratory evaluation, *Clin Chem* 29:279-283, 1983.
- Narins RG, editor: *Maxwell and Kleeman's clinical disorders of fluid and electrolyte metabolism*, ed 5, New York, 1994, McGraw-Hill.
- Oh MS, Carroll HJ: The anion hiato, *N Engl J Med* 297:814, 1977.

Tablas

Tabla 24-1. Volúmenes de los compartimentos.

Porcentaje del peso corporal	Porcentaje del agua corporal total	Volumen en un hombre de 70 kg
------------------------------	------------------------------------	-------------------------------



Agua corporal total	60		42 L
Agua extracelular	20	33	14 L
Plasma	5	8	3.5 L
Fluido intersticial	15	25	10.5 L
Agua intracelular	40	67	28 L

Tabla 24-2. Composición de los compartimentos corporales.

Plasma (mEq/L)	Agua plasmática (mEq/L)	Fluido intersticial (mEq/L H ₂ O)	Agua intracelular (mEq/L H ₂ O)
Cationes			
153	164.6	153	195
Na ⁺			
142	152.7	145	10
K ⁺			
4	4.3	4	156
Ca ⁺⁺			
5	5.4	(2-3)	3.2
Mg ⁺⁺			
2	2.2	(1-2)	26
Aniones			
153	164.6	153	195
Cl ⁻			
103	110.8	116	2
HCO ₃ ⁻			
28	30.1	31	8
Proteína			
17	18.3	-	55
Otros			
5	5.4	(6)	130
Osmolaridad			
296	294.6	294.6 (mOsm/L)	
Presión osmótica			
5712.8	5685.8	5685.8	
teórica (mm Hg)			

Tabla 24-3. Balance de agua en un adulto promedio bajo diferentes condiciones.

	<u>Ingestión (mL/día)</u>				<u>Excreción (mL/día)</u>		
	Ambiente Trabajo				Ambiente Trabajo		
	Normal	cálido	arduo		Normal	cálido	arduo
Agua de	1200	2200	3400	Orina	1400	1200	500

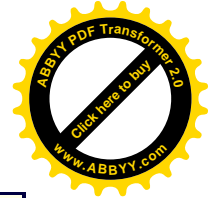


beber							
Agua en alimentos	1000	1000	1150	Agua imperceptible			
Agua de oxidación	300	300	450	Piel	400	400	400
				Pulmones	400	300	600
				Sudor	100	1400	3300
				Heces	200	200	200
TOTAL	2500	3500	5000		2500	3500	5000

Tabla 24-4. Cambios en el volumen y la distribución del agua corporal total, el contenido de sodio corporal total y la concentración de sodio plasmático con la deshidratación y la sobrehidratación.

	Agua corporal total	AEC	Sodio corporal total	AIC	Concentración de sodio plasmático
Deshidratación					
↑	Hipernatrémica	↓	<i>l</i> ↓	↓	nl o sl ↓
nl	Normonatrémica	↓	↓	nl	↓
↓	Hiponatrémica	↓	↓↓	↑	↓↓
Sobrehidratación					
↓	Intoxicación por agua	↑	↑	↑	nl
	Expansión del volumen del AEC				
nl	Normonatrémica	↑	↑	nl	↑
↓	Hiponatrémica	↑	↑	↑	<i>l</i> ↑
<i>nl</i> , Normal; <i>l</i> , ligeramente					

Tabla 24-5. Composición electrolítica y volumen de varias secreciones gastrointestinales en un adulto normal.



(mmol/L)	Volumen secretado (mL/día)	Concentración de electrolitos			
		Na ⁺	K ⁺	Cl ⁻	HCO ₃ ⁻
Jugo gástrico*	2500	8-120	1-30	8-100	0-20
Bilis	700-1000	134-156	4-6	83-110	38
Jugo pancreático	>1000	113-153	2-7	54-95	110
Intestino delgado	3000	72-120	3.5-7	69-127	30
Ileostomía	100-4000	112-142	4.5-14	43-122	30
Cecostomía	100-300	480-116	11-28	35-70	15
Heces fecales	100	<10	<10	<15	<15

La composición electrolítica del jugo gástrico varía, en dependencia de la acidez. A mayor acidez, menor concentración de sodio, mayor concentración de cloruros y menor concentración de bicarbonato. La concentración promedio es de aproximadamente 100 mmol/L. (Tomado de Locswook JS, Randall HT: *Bull NY Acad Med* 25:228-243, April 1949.)

Tabla 24-6. Causas del incremento o disminución del hiato aniónico.

Causas del incremento del hiato aniónico
Disminución de los cationes no medidos
Hipocalcemia
Hipomagnesemia
Incremento de los aniones no medidos
Asociado con la acidosis metabólica
Uremia (fallo renal)
Cetoacidosis
Envenenamiento por salicilato
No asociado necesariamente con acidosis metabólica
Hiperfosfatemia
Hipersulfatemia
Grandes dosis de antibióticos tales como penicilina y carbenicilina
Tratamiento con lactato, citrato o acetato
Incremento en la carga neta de la proteína como en la alcalosis
Causas de la disminución del hiato aniónico
Disminución de los aniones no medidos
Hipoalbuminemia
Hipofosfatemia
Incremento de los cationes no medidos
Hipercalcemia
Hiper magnesemia
Paraproteínas



Gama globulinas policlonales
Medicamentos tales como la polimixina B o litio
Subestimación del sodio sérico
Hiperproteinemia
Hipertrigliceridemia (turbidez)
Sobreestimación del cloruro sérico
Bromismo
Turbidez (por el método del tiocianato férrico)

Tabla 24-7. Métodos de medición de cloruro.

Método	1. Tiocianato mercuríco/férrico
Tipo de análisis	Cuantitativo, de punto final
Principio	$2\text{Cl}^- + \text{Hg}(\text{SCN}) \rightarrow \text{HgCl}_2 + 2(\text{SCN})^-$ $3(\text{SCN})^- + \text{Fe}^{+++} \rightarrow \text{A}_{\text{max}}\text{Fe}(\text{SCN})_3$ (<i>rojo</i>)
Uso	Suero, plasma, orina: manual, automatizado
Comentarios	Poco común, buena exactitud y precisión
Método	2. Titulación coulométrica
Tipo de análisis	Titulación cuantitativa, punto final
Principio	$\text{Ag}^+ + \text{Cl}^- \rightarrow \text{AgCl} (\downarrow)$
Uso	Suero, plasma, orina, fluidos, muy exacto; manual, automatizado
Comentarios	Método de referencia
Método	3. Selectivo de iones
Tipo de análisis	Cuantitativo, punto final potenciométrico o cinético
Principio	$\text{Ag}^+/\text{AgCl}_{(s)}$, y $\text{Cl}^- + \text{AgCl}/\text{AgS}_{(s)}$
Uso	Suero, plasma, orina, fluidos, sudor; manual, automatizado
Comentarios	El método más común, buena exactitud y precisión
Método	4. Enzimático
Tipo de análisis	Cuantitativo, cinético



Tipo de análisis	Cuantitativo, cinético
Principio	EDTA-Ca ⁺⁺ + α -amilasa (<i>inactiva</i>) Cl ⁻ → EDTA + α -amilasa-Ca ⁺⁺ (<i>activa</i>) α -amilasa-Ca ⁺⁺ (<i>activa</i>) + CNP-G7 + α y β -glucosidasa → 2-cloro-4-nitrofenol (λ_{max} = 405 nm)
Uso	Adaptable a una amplia variedad de instrumentos
Comentarios	Está en investigación
CNP-G7, 2-cloro-4-nitrofenol- β -D-maltoheptasido	

Tabla 24-8. Métodos de análisis de sodio y potasio.

Método	1. Espectroscopía de emisión atómica de flama (EAAF)
Tipo de análisis	Cuantitativo de la concentración de masa
Principio	Emite fotones de átomos excitados
Uso	Suero, orina, LCR, otros fluidos corporales
Comentarios	Método de referencia; posible error de dilución
Método	2. Potenciometría de electrodo selectivo de iones (ESI)
Tipo de análisis	Cuantificación de la actividad química
Principio	El electrodo selectivo de iones mide el cambio potenciométrico como función de la concentración de iones
Uso	Suero, orina, LCR
Comentarios	Posible error de dilución por procedimiento indirecto; el análisis de orina puede tener un rango lineal limitado
Método	3. Ionóforo cromogénico
Tipo de análisis	Acomplejamiento inico cuantitativo
Principio	K ⁺ + ionóforo → complejo coloreado
Uso	Suero

Uso	Suero
Comentarios	Instrumentos del consultorio del médico; posible error de dilución
Método	4. Enzimático
Tipo de análisis	Cuantificación de actividad enzimática dependiente de Na^+ o K^+
Principio	El Na^+ o K^+ de la muestra modifican la actividad de la enzima dependiente de Na^+ o K^+
Uso	Suero
Comentarios	Actualmente en investigación
<i>LCR</i> , Líquido cefalorraquídeo	

Figuras

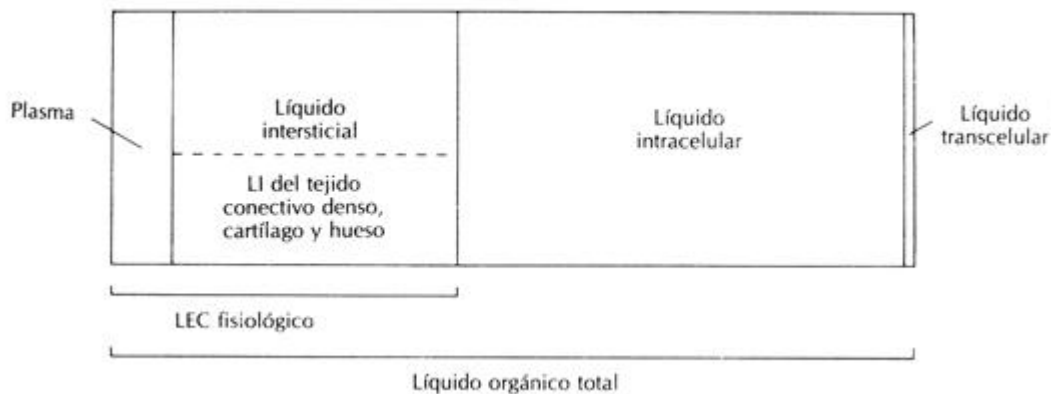


Figura 24-1 Compartimentos de agua corporal. Recordar que el agua extracelular anatómica (*AEC*) incluye el agua extracelular fisiológica y el agua transcelular. *FI*, Fluido intersticial.

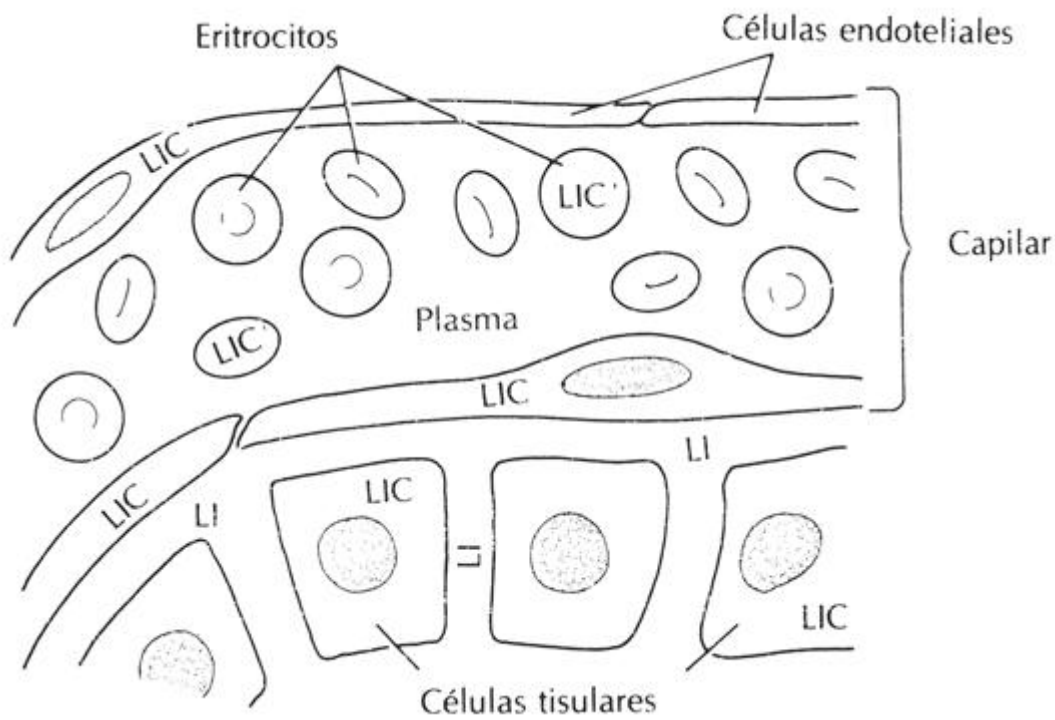


Figura 24-2 Diagrama de plasma, fluido intersticial, FI, y agua intracelular, AIC, en tejido, a nivel microscópico.

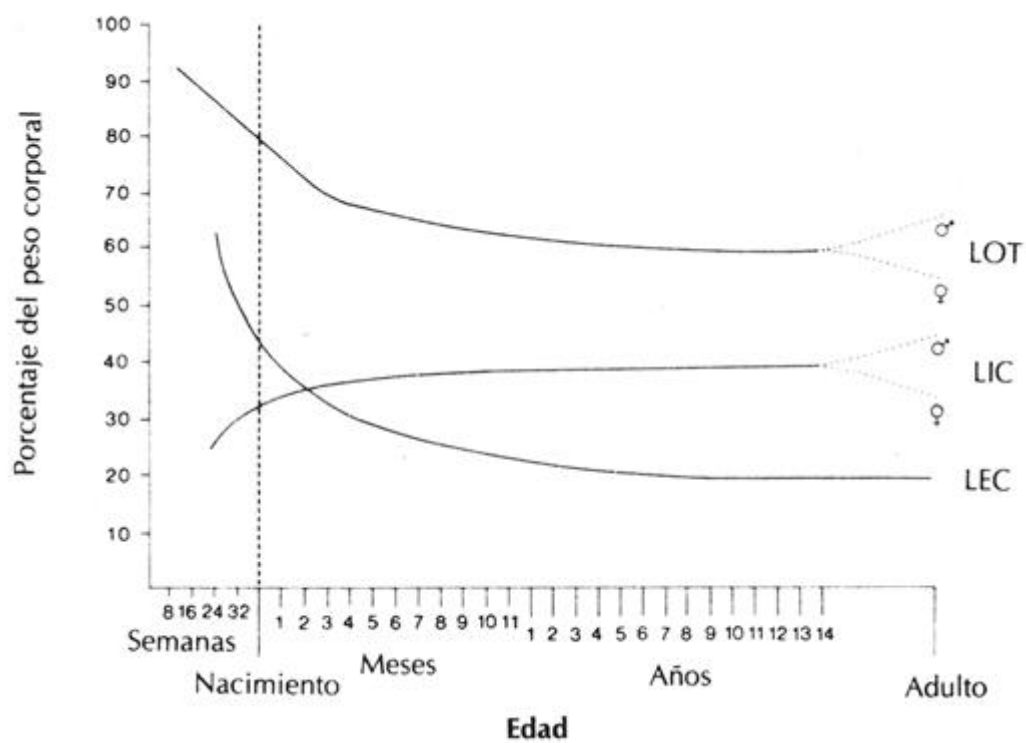
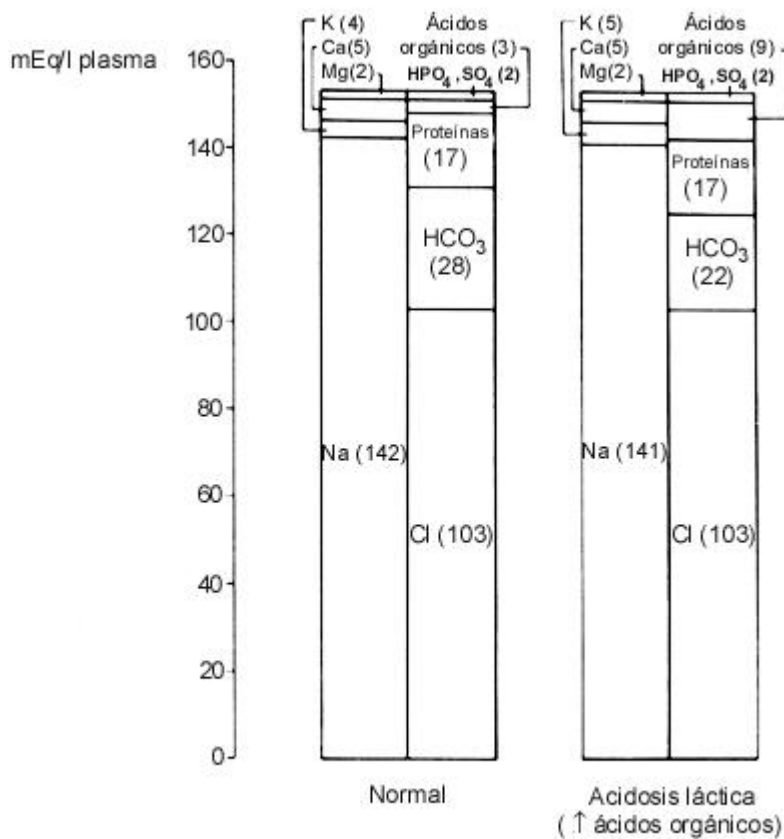


Figura 24-3 Cambios en los compartimentos de agua corporal (expresados como

porcentaje del peso corporal) con la edad. *ACT*, Agua corporal total; *AIC*, agua intracelular; *AEC*, agua extracelular. (Adaptado de los datos de Friis-Hansen, B: *Acta Paediatr Scand* 46[suppl 110]:1, 1957)



$$[Na] + [K^+] - [Cl^-] - [HCO_3^-] \quad 142 + 4 - 103 - 28 = 15 \quad 141 + 5 - 103 - 22 = 21$$

Figura 24-4 Incremento del hiato aniónico debido a un incremento en los aniones no medidos. Números en paréntesis, concentración de iones en unidades de mEq/L plasma. Obsérvese que la suma de cationes (lado izquierdo de cada gráfico de barras) es siempre igual a la suma de los aniones (lado derecho de cada gráfico de barras), tanto en condiciones normales como en la presencia de acidosis láctica. La suma de las concentraciones de aniones no medidos (ácidos orgánicos, HPO₄²⁻, SO₄²⁻, y proteínas) es mayor que la suma de las concentraciones de los cationes no medidos (Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺). Durante la acidosis láctica, la diferencia entre los aniones no medidos y los cationes se hace mayor debido a que la producción de ácido láctico incrementa la concentración de ácidos orgánicos.

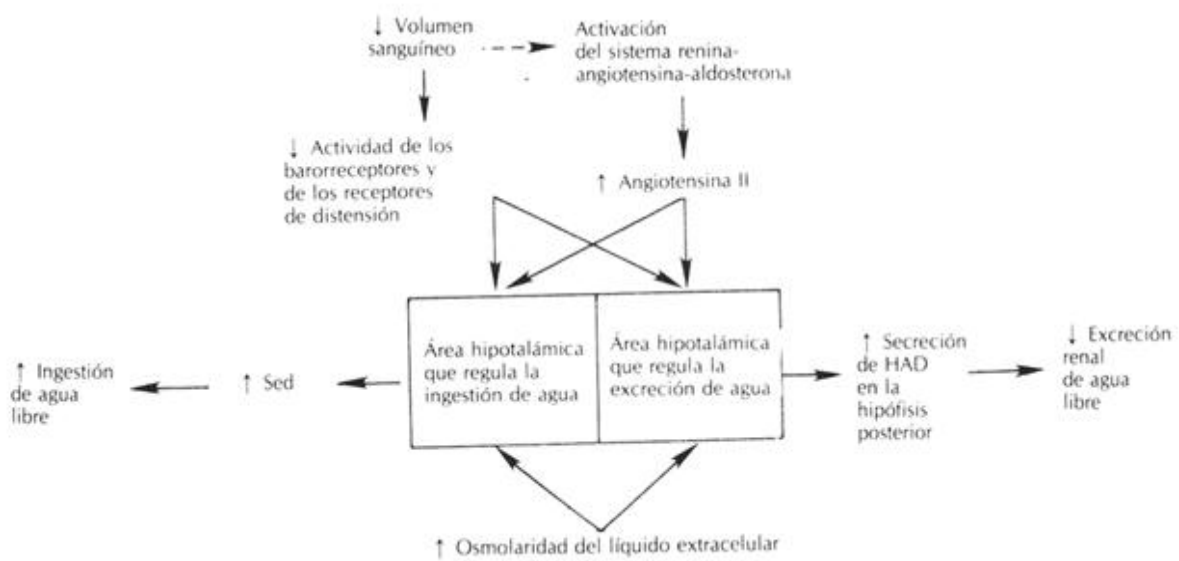


Figura 24-5 Regulación hipotalámica del balance de agua.

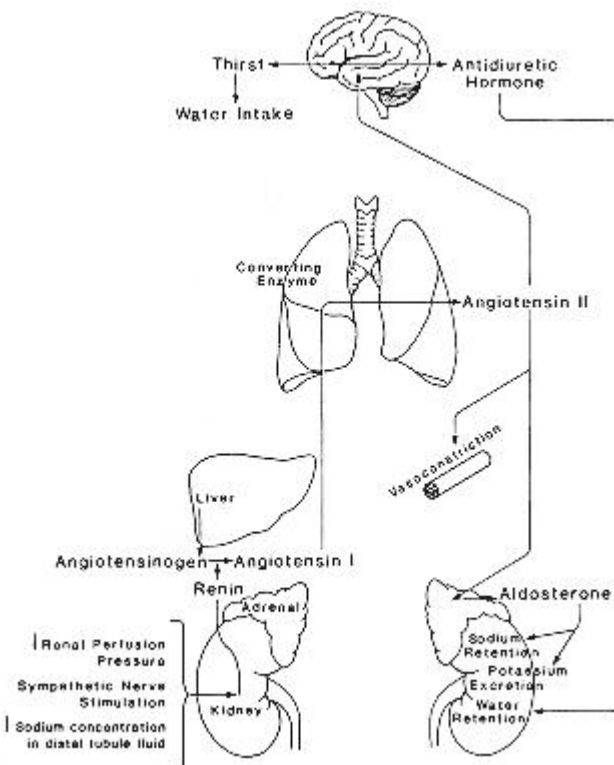


Figura 24-6 Sistema renina-angiotensina-aldosterona.

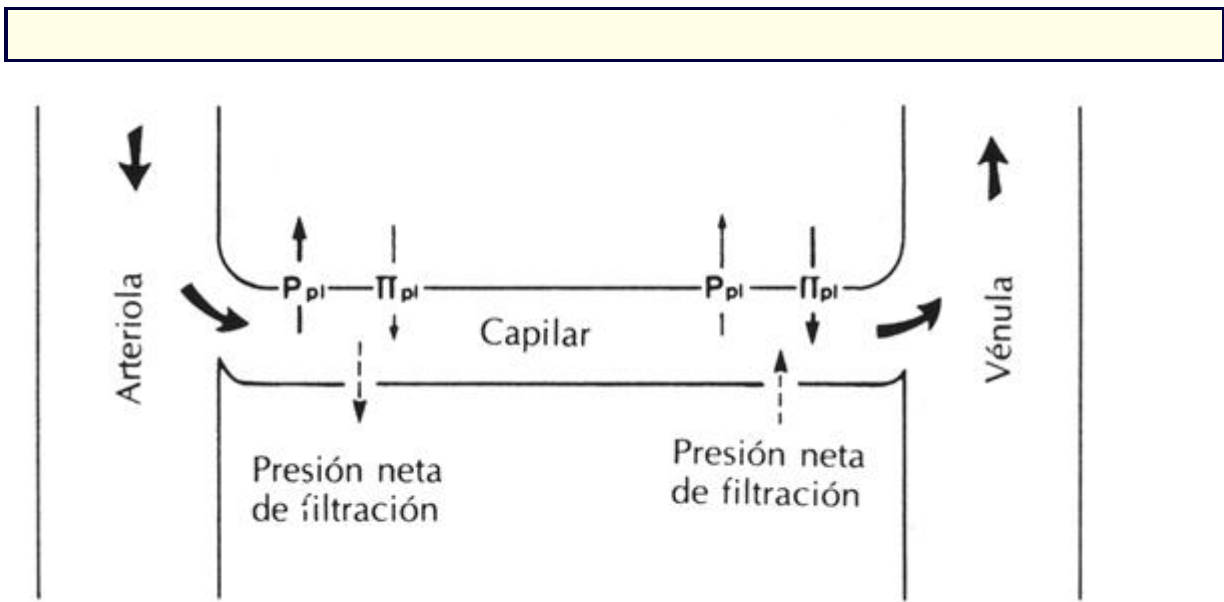


Figura 24-7 Hipótesis de Starling de la distribución del agua entre los compartimentos del plasma y del fluido intersticial. El grosor de las flechas representa la presión hidrostática del plasma (P_{pl}) y la presión oncótica del plasma (Π_{pl}) indica sus relativas magnitudes. Las flechas discontinuas indican la dirección de la presión de filtración neta.

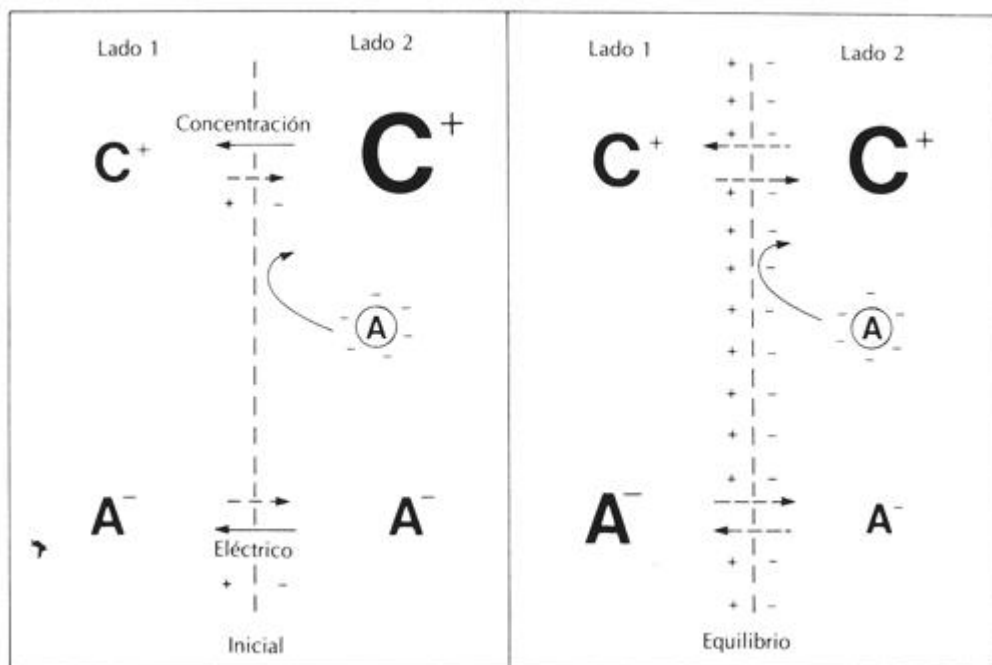


Figura 24-8 Equilibrio de Gibbs-Donnan. Distribución de iones difusibles y no difusibles y desarrollo de un gradiente de potencial eléctrico a través de una membrana cuando un anión polivalente no difusible (A^-) con un catión difusible (C^+) se adiciona a un lado de la membrana en una solución de cationes (C^+) y aniones (A^-) difusibles.

Inicialmente un catión difusible se mueve hacia su gradiente de concentración del lado 2 al lado 1. Este movimiento genera un gradiente de potencial eléctrico a través de la membrana (el lado 2 es negativo con respecto al lado 1). El anión difusible se mueve hacia el gradiente de potencial eléctrico del lado 2 al lado 1. En el equilibrio, la concentración de cationes difusibles será mayor en el lado 2 que en el lado 1 (según se indica por el tamaño de los símbolos), mientras que la concentración de aniones difusibles será mayor en el lado 1 que en el lado 2. No ocurre movimiento neto de iones difusibles a través de la membrana porque no existen gradientes electroquímicos. El gradiente de concentración para cada ion está equilibrado por un gradiente eléctrico equivalente pero directamente opuesto.

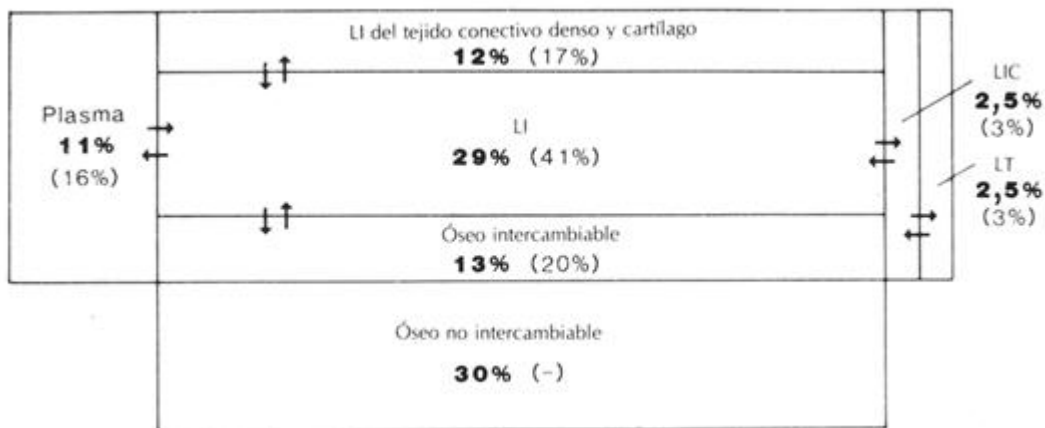


Figura 24-9 Distribución de sodio entre los compartimentos del cuerpo. *Números en negrita*, porcentajes de sodio corporal total en varios compartimentos; *números entre paréntesis*, porcentajes de sodio intercambiable en varios compartimentos; *AIC*, agua intracelular; *LI*, fluido intersticial; *ATC*, agua transcelular.

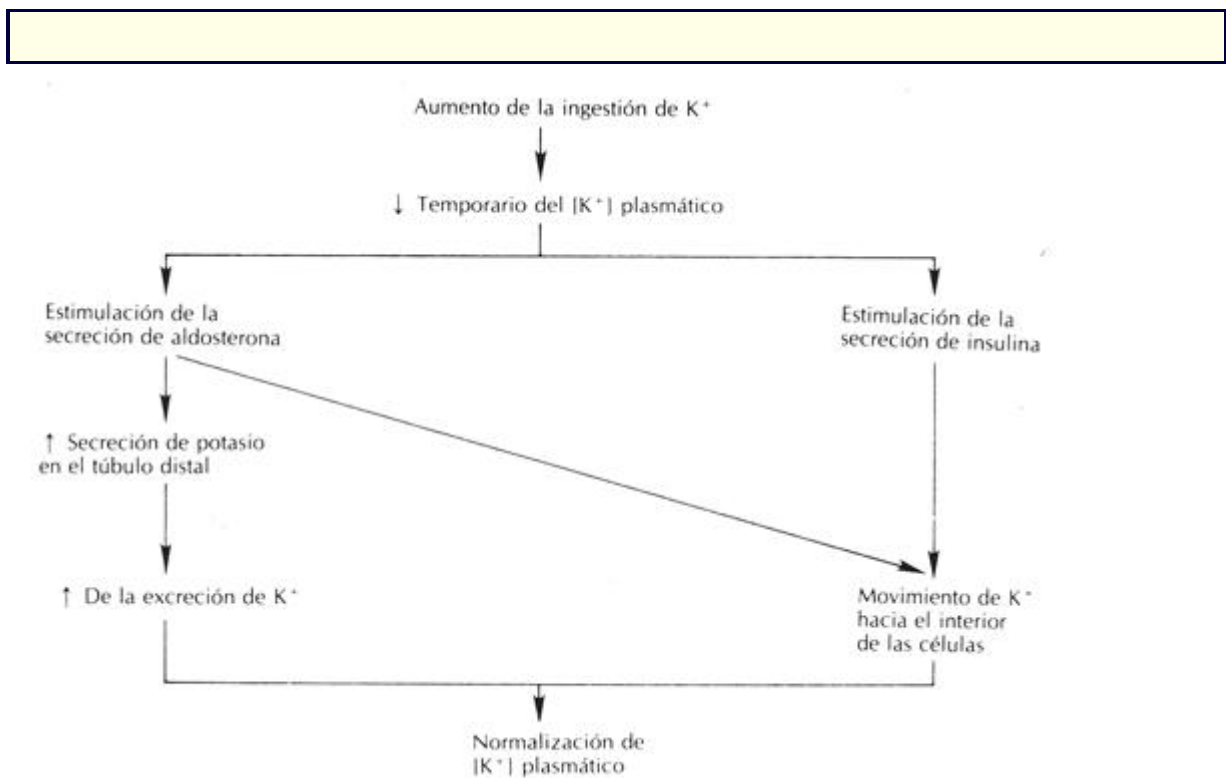


Figura 24-10 Control de la concentración de potasio plasmático.

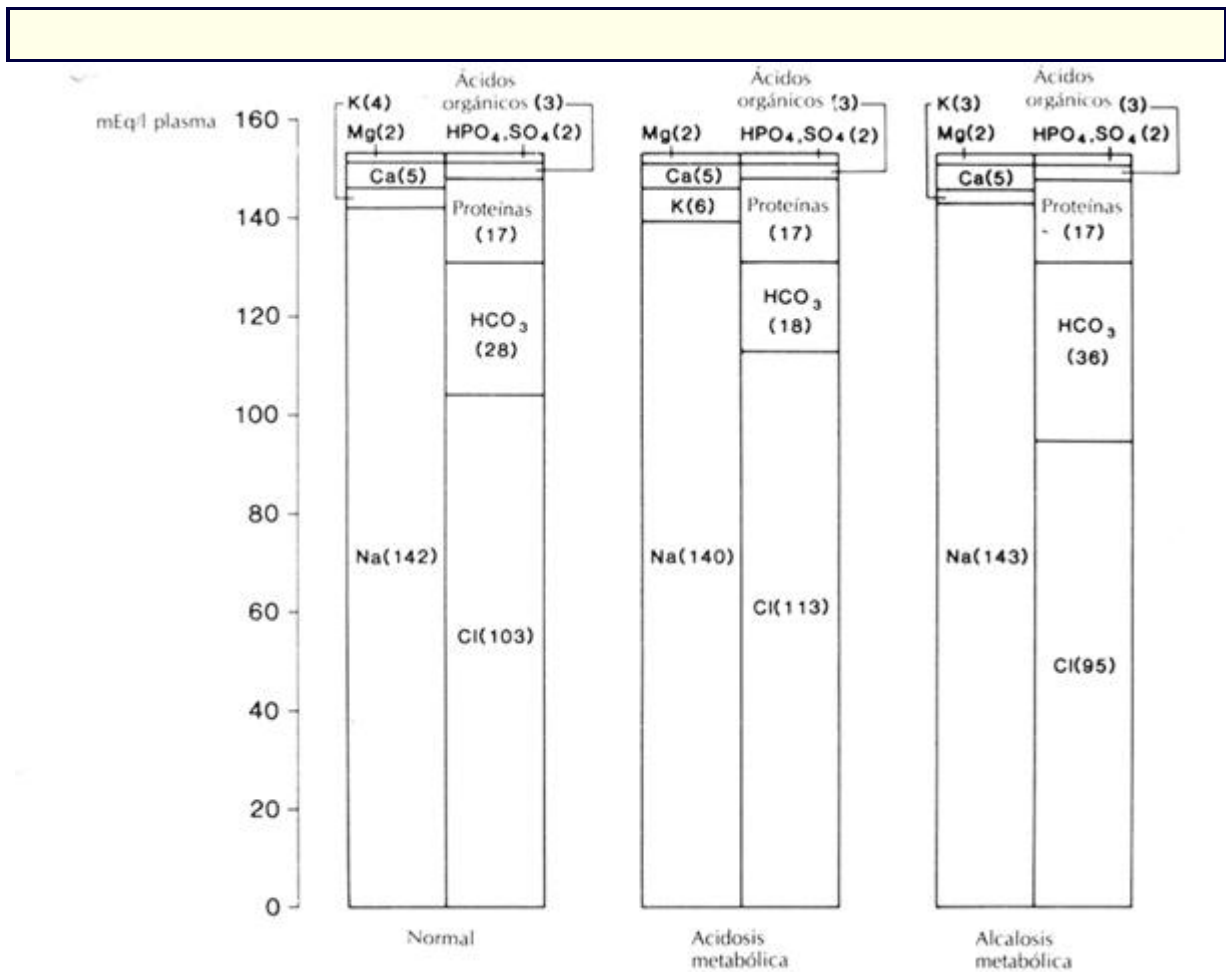


Figura 24-11 Concentración de electrolitos en plasma (mEq/L) con acidosis metabólica y alcalosis metabólica comparado con lo normal. En el ejemplo de acidosis metabólica mostrado, no hay incremento en los ácidos orgánicos, sólo pérdida de bicarbonato. La acidosis metabólica puede atribuirse a un aumento de los ácidos orgánicos (ver Fig. 24-4). En estos casos el cloruro puede no estar aumentado. Obsérvese que la concentración de potasio extracelular está elevada en la acidosis metabólica y disminuida en la alcalosis metabólica. Bajo todas las condiciones la concentración de aniones es igual a la concentración de cationes.

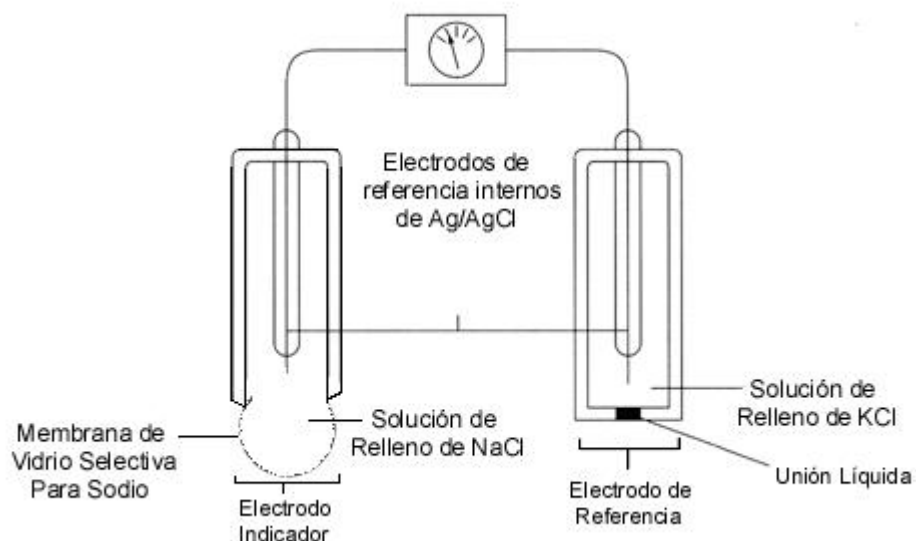


Figura 24-12 Esquema de un electrodo de vidrio selectivo para sodio. La membrana de vidrio está hecha selectiva para el sodio mediante relaciones molares de Na_2O y Al_2O_3 en la matriz de SiO_2 .

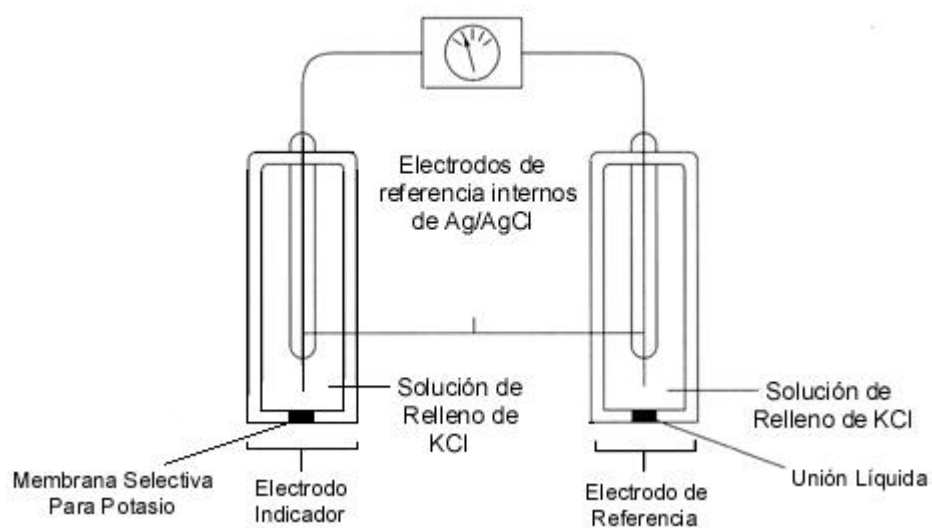


Figure 24-13 Esquema de un electrodo selectivo de potasio. La membrana selectiva de potasio está típicamente compuesta de una película de cloruro de polivinilo en la cual se han disuelto moléculas de valinomicina.



CAPÍTULO 25

25. Regulación del Equilibrio Ácido-Base y Alteraciones Relacionadas

John E. Sherwin

Control del equilibrio ácido-base

Ácidos y bases

Homeostasis del oxígeno y anhídrido carbónico

Equilibrio de ácido-base

Alteraciones del equilibrio ácido-base

Definiciones

Alteraciones por déficit de bases

Alteraciones por exceso de bases

Instrumentación

Acidosis

Cicadáceas metabólica

Acidosis respiratoria

Alcalosis

Alcalosis metabólica

Alcalosis respiratoria

Cambio de analitos en la enfermedad

Métodos de análisis

Análisis de gases en sangre y saturación de oxígeno

Anhídrido carbónico

Ácido láctico

Ácido piruvico

OBJETIVOS

- ♦ Delinear el mecanismo amortiguador de sangre de los sistemas de amortiguación de bicarbonato y hemoglobina.
- ♦ Explicar la regulación del ácido-base por el riñón con respecto a lo siguiente: excreción de iones de hidrógeno, reacción de iones de bicarbonato intercambio de sodio hidrógeno, reacción de iones de bicarbonato, intercambio de sodio hidrógeno, secreción de amoníaco.
- ♦ Indicar la ecuación de Henderson-Hasselbalch, identificando los componentes respiratorios y metabólicos; relacionar la ecuación con desórdenes con ácido-base; y



calcular el pH dada la información apropiada.

- ♦ Para cada uno de los siguientes estados patológicos, identificar los valores esperados del pH, PO_2 , y PCO_2 como normal, aumentado, o disminuido, e indicar la respuesta fisiológica para los estados de la enfermedad.
 - Hiperventilación inducida por drogas
 - Cetoacidosis aguda hiperglucémica resultado de vómitos persistentes
 - Enfisema crónico.
- ♦ Definir la saturación de oxígeno y P_{50} , y describir el efecto de la siguiente sobre la disociación de oxígeno de la hemoglobina:
 - 2,3-DPG
 - pH
 - PCO_2

Términos Claves

acidemia Una condición de pH reducido en la sangre

acidosis Una condición patológica resultante de acumulación de ácidos en la sangre o pérdida de base desde la sangre.

acidosis metabólica Pérdida patológica de bases del organismo.

acidosis respiratoria Retención patológica de CO_2 en el organismo causado por cambios respiratorios.

alcalemia Una condición de pH aumentado en la sangre.

alcalosis Una condición patológica resultante de la acumulación de base o pérdida de ácidos del organismo.

alcalosis hipoclorémica Alcalosis metabólica resultante de un aumento de bicarbonato en la sangre secundario a la pérdida de cloruro del organismo.

alcalosis metabólica Acumulación patológica de base del organismo.

alcalosis respiratoria Disminución patológica de CO_2 causada por cambio respiratorio.

alveolos pequeños saquitos de las paredes del espacio alveolar a través de los cuales se realiza el intercambio de gases entre el aire alveolar y la sangre capilar pulmonar.

amino primario ($-NH_2$) de una proteína para formar una forma unida de CO_2 estable.

amortiguador (tampón o buffer) Una solución que consiste de un ácido débil y su base conjugada, que se resiste a cambio en el pH al agregar una base o ácido fuerte

anhidrasa carbónica Una enzima que cataliza la reacción entre CO_2 y agua para formar ácido carbónico (H_2CO_3).

apnea Cese de la respiración.

base conjugada Forma anionica no protonada de un ácido débil correspondiente.

bradicardia Disminución del latido del corazón a menos de 60 latidos por minuto.



componente metabólico La concentración de bicarbonato en plasma.

componente respiratorio El “ αP_{CO_2} ” o componente ácido, que es inmediatamente modificado por status respiratorio. “ α ” es el coeficiente de la solubilidad (o Bunsen) coeficiente de CO_2 .

déficit de base relativo Un término que describe la proporción disminuida de HCO_3^-/H_2CO_3 causada por un aumento de P_{CO_2} . El HCO_3^- (base) es bajo relativo al PCO_2 .

desplazamiento de cloruro Intercambio de Cl^- del suero por HCO_3^- de las células sanguíneas rojas en tejidos periféricos en respuesta a la PCO_2 de la sangre. El intercambio se invierte en los pulmones.

desplazamiento isohídrico La serie de reacciones en células rojas sanguíneas donde se toma el CO_2 y el oxígeno es liberado sin la producción excesiva de iones de hidrógeno.

ecuación Henderson-Hasselbalch Describe la relación entre pH, el pK, de un sistema amortiguador, y la proporción de la base conjugada para con un ácido débil.

espacio entre iones La concentración de aniones no-determinados, calculados como la diferencia entre los cationes medidos y los aniones medidos.

exceso de base relativo Nombre de la proporción elevada de HCO_3^-/H_2CO_3 causada por la disminución de P_{CO_2} . El HCO_3^- (base) está elevado en relación a la PCO_2 .

exceso o déficit de base La diferencia entre los ácidos titulables y bases de una muestra de sangre y una muestra de sangre normal a pH 7.4, un PCO_2 de 40mm Hg., y una temperatura de 37° C.

hiato aniónico La concentración de aniones no-determinados, calculados como la diferencia entre los cationes medidos y los aniones medidos.

hipercapnia Una condición de exceso de anhídrido carbónico en la sangre.

hipoxia Una condición de contenido bajo de oxígeno en los tejidos.

cambio isohídrico Serie de reacciones que se llevan a cabo en los eritrocitos donde el CO_2 es incorporado y el oxígeno es liberado sin la producción excesiva de iones de hidrógeno.

P_{50} La presión parcial de oxígeno en que la hemoglobina está medio saturada a la mitad (50%) con oxígeno.

pH El logaritmo negativo de la concentración de iones hidrógeno.

pK_a El logaritmo negativo de la constante de disociación de un ácido débil; también el pH de un amortiguador donde la concentración de un ácido débil y su base conjugada son iguales. La capacidad de amortiguación general máxima ocurre cuando $Pk_a = pH$

presión parcial la presión ejercida por un gas, bien solo o mezclado con otros gases. La presión parcial de un gas es denominada por la P que precede el símbolo de este gas (generalmente en letras mayúsculas pequeñas); por ejemplo, la presión parcial de CO_2 es PCO_2 .

reacción carbamino Una reacción química covalente entre CO_2 y el



grupo amino primario ($-\text{NH}_2$) de una proteína para formar una forma unida de CO_2 estable.

saturación de oxígeno Un término que define la fracción del total de hemoglobina (Hb) en la forma de HbO_2 en un PO_2 definido. Porcentaje de saturación = $100 (\text{HbO}_2)/(\text{HbO}_2 + \text{Hb})$.

surfactante Agente que disminuye la tensión de superficial. Se aplica a agentes que cubren las superficies alveolares pulmonares.

ventilación El intercambio de gases entre los pulmones y el aire ambiental.

Control del Equilibrio Ácido-Base

Ácidos y bases

Definiciones.

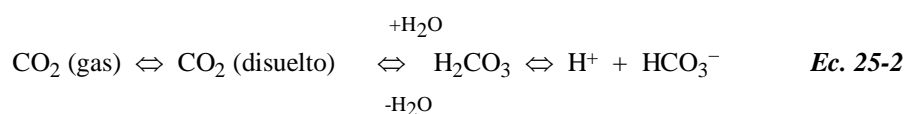
Utilizando la definición más simple, un ácido se define como una sustancia que libera protones o iones (H^+) hidrógeno, mientras que una base es sencillamente definida como una sustancia que acepta protones o H^+ . Ambos ácidos y bases son además definidos por su grado de afinidad por el H^+ . Un ácido fuerte tiene poca afinidad por H^+ y así se desliga fácilmente de H^+ , mientras que un ácido débil tiene alguna afinidad por H^+ y por tanto se desliga menos fácilmente de H^+ . Una base fuerte tiene fuerte afinidad por H^+ . Una base pobre tiene una baja afinidad para H^+ . Si una molécula difiere de otra por sólo un protón, los dos se llaman un par conjugado ácido-base. Ejemplos fisiológicos de un ácido débil y su base conjugada son el ácido carbónico (H_2CO_3) y bicarbonato (HCO_3^-). La reacción de equilibrio es como sigue en la ecuación 25-1:



Este equilibrio recae del lado derecho a pH fisiológico porque el bicarbonato, la base conjugada, tiene una afinidad débil por iones de hidrógeno.

Fuentes dietéticas y metabólicas de ácidos y bases.

Dos tipos de ácidos son tratados en los estados fisiológicos: ácidos fijos y ácidos volátiles. Ácidos fijos son los no gaseosos tales como iones de fosfato (HPO_4^{2-}) y sulfato (HSO_4^-) o ácidos orgánicos tales como ácido láctico, ácido acetoacético y beta-hidroxibutírico. El ácido volátil fisiológicamente importante es el ácido carbónico (H_2CO_3). La volatilidad del ácido surge de su capacidad para disociarse en agua con el anhídrido carbónico (CO_2), que puede ser liberado como un gas. El esquema de reacción para ácido carbónico es como sigue:



en un extremo del equilibrio está el anhídrido carbónico, que puede ser considerada



una forma anhídrido de H_2CO_3 , y en el otro extremo está el HCO_3^- , la base conjugada para H_2CO_3 . Aunque la reacción del CO_2 y el agua para formar H_2CO_3 ocurrirá espontáneamente la enzima anhidrasa carbónica facilita esta reacción en vivo.

Carbohidratos, lípidos y proteínas son metabolizadas por reacciones de oxidación que generan ácidos que deben ser neutralizados para poder mantener un pH celular constante. Bajo condiciones anaeróbicas tales como aquellas producidas por estrés respiratorio o ejercicio extenuante, los carbohidratos son metabolizados a ácidos láctico y pirúvico, que se acumulan hasta que una oxigenación normal es lograda. Estos ácidos pueden ser metabolizados mas aún hasta el producto final de la oxidación, anhídrido carbónico, cuando el metabolismo aeróbico está disminuido. Los triglicéridos son metabolizados a ácidos grasos, que pueden ser adicionalmente metabolizados a cuerpos cetónicos (ácido acetoacético y ácido β -hidroxibutírico) bajo condiciones anaeróbicas. Por último estos metabolitos de lípidos pueden ser oxidados nuevamente hasta anhídrido carbónico. Las proteínas son hidrolizadas a aminoácidos, que luego son convertidos a anhídrido carbónico. Esas proteínas compuestas de sulfuro que contienen aminoácidos que contienen sulfuro son catabolizadas a sales de ácido sulfúrico. Ácidos nucleicos y algunos lípidos contienen fósforo y son metabolizadas a sales de ácido fosfórico.

pH, ion hidrógeno y amortiguadores.

Sugiero repasar la discusión de pH y cálculos de amortiguadores en el capítulo 1. Recuerde que, en lugar de describir la concentración de H^+ en moles por litro (M), la convención aceptada es el uso de pH, que es definido como el logaritmo negativo de la concentración de H^+ .

Amortiguadores fisiológicos.

Sangre entera normal humana es amortiguada a un pH ligeramente alcalino ligero de 7.35 a 7.45, que corresponde a una concentración de H^+ de $4.5 \times 10^{-8}\text{M}$ a 3.5×10^{-8} . La capacidad de amortiguación depende de la concentración del amortiguador y la relación entre el pK_a del amortiguador y el pH deseado. Un amortiguador es considerado más efectivo cuando el pH difiere menos de 2 unidades de su pK_a . Tiene máxima capacidad de amortiguación cuando su pK_a es igual al pH. Para una amortiguación máxima de la sangre el pK_a de los amortiguadores debe por lo tanto estar cerca del pH fisiológico del pH, esto es, pH 7.4. Los amortiguadores fisiológicamente importantes que mantienen este rango estrecho de pH (observado) en el organismo son la hemoglobina, bicarbonato, fosfato, y proteínas. Tabla 25-1 lista el pK_a y la concentración de estos sistemas de amortiguación y sus relativas capacidades de amortiguación.

Sistema de amortiguación de bicarbonato.

La ecuación de Henderson-Hasselbalch para el sistema de amortiguación de ácido carbónico- bicarbonato (ecuación 25-3) es como sigue:

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log \frac{[\text{HCO}_3^-]}{[\text{H}_2\text{CO}_3]} \quad \text{Ec. 25-3}$$



El pK_a medido es 6.33 a 37° C. En lugar de estar al nivel más alto en capacidad de amortiguación con una proporción de 1:1 el HCO_3^- a H_2CO_3 , el sistema amortiguador de ácido carbónico-bicarbonato al pH de la sangre de 7.4 está en la proporción de 20:1.

$$pH = pK_a + \log \frac{[HCO_3^-]}{[H_2CO_3]} = 6.33 + \log 20 = 7.4 \quad \text{Ec. 25-4}$$

Esta proporción 20:1 es mantenida primariamente por los pulmones, que expelen el CO_2 producido durante el metabolismo de nutrientes.

En la ecuación 25-3 existen tres incógnitas: pH $[HCO_3^-]$ y $[H_2CO_3]$. Aunque el pH se puede medir no existe una medición directa del $[HCO_3^-]$ o el $[H_2CO_3]$. Para usar esta ecuación, el término H_2CO_3 es reemplazado por un sistema que sí es medible. La concentración de H_2CO_3 es proporcional a la cantidad de CO_2 disuelto (ecuación 25-2). Por lo tanto, uno puede reemplazar $[H_2CO_3]$ con el término αPCO_2 , donde α (el coeficiente Bunson) es el coeficiente de solubilidad del CO_2 . El término pK_a en la ecuación de Henderson-Hasselbalch es modificada para reflejar el equilibrio entre CO_2 disuelto y HCO_3^- . La ecuación modificada de Henderson-Halsselbalch que describe el equilibrio en la ecuación 25-2 es como sigue:

$$pH = pK'_a + \log \frac{[HCO_3^-]}{\alpha PCO_2} \quad \text{Ec. 25-5}$$

El pK'_a aparente en plasma humano es 6.1 a 37° C. El coeficiente de solubilidad para CO_2 en plasma a 37° C es $0.031 \text{ mmol} \times L^{-1} \times \text{mm Hg}^{-1}$. La concentración de base excede ampliamente la de ácido en este sistema amortiguador de plasma, reflejando las exigencias a las que el metabolismo somete al organismo, que produce primariamente ácidos. Este sistema amortiguador fue diseñado para procesar el producto de los desperdicios metabólicos primarios, el CO_2 . El componente CO_2 en el sistema amortiguador es eliminado por los pulmones.

El contenido total de CO_2 (TCO_2) de plasma es descrito como

$$TCO_2 = CO_2 (\text{disuelto}) + [HCO_3^-] + [H_2CO_3] \quad \text{Ec. 25-6, a}$$

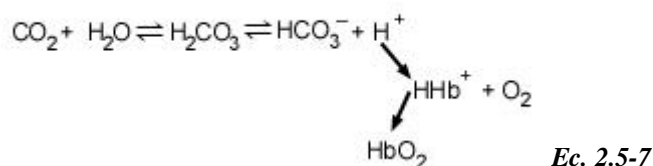
Uno puede hacer caso omiso del término $[H_2CO_3]$ porque es muy pequeño (1/20 de $[HCO_3^-]$) y puede reemplazar el CO_2 (disuelto) con el término αCO_2 . Por lo tanto, la ecuación puede ser reducida a

$$TCO_2 = \alpha PCO_2 + H_2CO_3 + [HCO_3^-] \quad \text{Ec. 25-6, b}$$

Dos de las tres incógnitas se determinan fácilmente, permitiendo el cálculo de la tercera (ver págs 474 y 480)

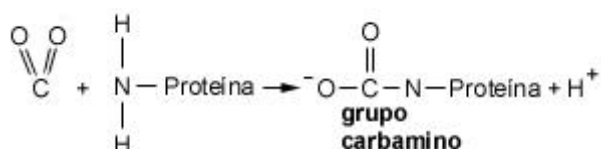
Hemoglobina.

El mayor amortiguador de la sangre es la hemoglobina, que se ubica en las células rojas de la sangre. La hemoglobina (Hb) recoge el H^+ libre para que la siguiente reacción proceda hacia la derecha:



La hemoglobina y las proteínas del suero tienen altas concentraciones de residuos de histidina. El grupo imidazol de histidina (Fig. 25-1) tiene un pK_a de aproximadamente 7.3. Es esta combinación de alta concentración y pK_a apropiado que convierte a la hemoglobina en el agente amortiguador dominante en la sangre a pH fisiológico. La cantidad de CO_2 formado en los tejidos periféricos es transportado en la porción de plasma de la sangre como HCO_3^- , con el H^+ adherido a la hemoglobina dentro del eritrocito (Fig. 25-2). El CO_2 del ácido carbónico es responsable de unos 2 mmol/L de CO_2 en sangre venosa pero solo de aproximadamente 1 mmol/L en la sangre arterial.

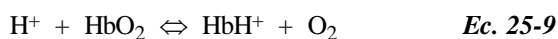
Cantidades significativas de CO_2 son transportadas como un medio unido a proteínas. El CO_2 reacciona no enzimáticamente con los grupos amino accesibles de proteínas para formar un *grupo carbamino*:



Ec. 25-8

Aproximadamente 0.5 mmol/L de CO_2 es transportado de esta manera.

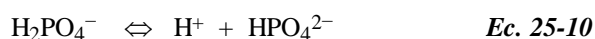
La diferencia arteriovenosa observada en el contenido total de CO_2 es, casi por completo, el resultado de la formación de bicarbonato en las células rojas de la sangre. En los pulmones, en la medida en que la hemoglobina desoxigenada se convierte en oxigenada y el CO_2 es liberado, el H^+ es liberado de la hemoglobina porque la hemoglobina oxigenada (HbO_2) es un ácido más fuerte que la hemoglobina desoxigenada (HbH). En los pulmones, entonces, la reacción en la ecuación 25-7 procede hacia la izquierda. El H^+ es liberado y reacciona con el HCO_3^- transportado para formar CO_2 que los pulmones ahora puede liberar (Fig. 25-2). La ecuación general que relaciona el proceso amortiguador al de la oxigenación es



La reacción "hacia delante" ocurre en tejidos donde el H^+ es relativamente alto y una relativa baja concentración de O_2 , mientras que la acción en inversa ocurre en los pulmones, donde la concentración de O_2 es relativamente alta.

Fosfato y proteínas.

El fosfato es un componente amortiguador menor de la sangre, con la siguiente reacción de equilibrio:



El pK_a de esta reacción es 6.8. El amortiguador de fosfato es un amortiguador importante en la orina, que contiene relativamente pocas proteínas, hemoglobina o bicarbonato. Los amortiguadores de fosfato en la sangre son fosfatos inorgánicos, pero tanto los fosfatos orgánicos como los inorgánicos actúan como amortiguadores intracelulares. Las proteínas de plasma también actúan como amortiguadores en la sangre. Este efecto amortiguador es menor comparado con el sistema de bicarbonato o el sistema de hemoglobina (Tabla 25-1).

Homeostasis de oxígeno y anhídrido carbónico

Presión parcial .

El análisis de gases en la sangre es realizado para determinar la presión parcial de oxígeno y anhídrido carbónico (PO_2 y PCO_2 respectivamente). Históricamente, las unidades de PO_2 y PCO_2 han sido milímetros de mercurio (mm Hg), o torr, y estos todavía son utilizados por una mayoría de laboratorios en los Estados Unidos. La unidad internacional para presión parcial es el pascal, o Pa ($1 \text{ mm H} = 133.3224 \text{ Pa}$). La Tabla 25-2 muestra cómo es la composición del aire atmosférico, y del aire alveolar, (aire dentro de los pulmones), y aire expulsado. La humedad hace una contribución substancial de la composición de aire en los pulmones, y esto altera las presiones parciales de los otros gases. Una corrección para el volumen de gas debido al vapor de agua es por lo tanto esencial; a 37°C , el PH_2O de la sangre es de aproximadamente 47 mm Hg.

Dos términos utilizados al discutir sobre el contenido de oxígeno en la sangre son *saturación de oxígeno* y P_{50} . Saturación de oxígeno es el porcentaje del total de la hemoglobina presente como hemoglobina oxigenada. El término P_{50} indica la presión parcial de oxígeno en que la hemoglobina está saturada al 50% con oxígeno.

Ventilación.

Ventilación es diferenciado de respiración en que *ventilación* es el proceso mecánico de mover aire dentro y fuera de los pulmones, y *respiración* es el intercambio de gases entre la atmósfera y el organismo. El intercambio de gases entre el aire y los capilares de la circulación pulmonar ocurre en el *alvéolo*. La frecuencia normal de respiración es de 13 a 16 veces por minuto.



Las paredes del pulmón contienen tejidos elásticos conectivos que se colapsarían si no fuese por la tensión superficial entre la superficie del pulmón y la pared de la cavidad torácica. La tensión superficial de las paredes internas del alvéolo, en cambio, tiene la tendencia a colapsar el alvéolo después de la expulsión, cuando el alvéolo está vacío. Esta tensión de superficie es reducida por la presencia de un complejo fosfolípido-lipoproteínico, un *surfactante*, que cubre las paredes alveolares con una película delgada y permite que las paredes alveolares puedan ser fácilmente reinfladas. Bebes prematuros sin suficiente capa surfactante en las paredes alveolares pueden tener dificultades respiratorias debido a la tendencia del alvéolo a colapsarse. Es por esta razón que la proporción lecitina-esfingomielina en el fluido amniótico es determinado para evaluar el desarrollo del pulmón fetal (ver capítulo 40).

Intercambio de gases.

La transferencia de gas en los alvéolos es un fenómeno dependiente de la concentración. El aire aspirado (en una habitación) tiene una PO_2 relativamente alta (158 mm Hg) y una baja PCO_2 (0.3 mm Hg). Las presiones de oxígeno y anhídrido carbónico en la sangre capilar de los pulmones son 50 y 40 mm Hg respectivamente. Debido a que la PO_2 de la sangre es más baja que la del aire aspirado y la PCO_2 de la sangre es más alta que la PCO_2 del aire en la habitación, los gases difunden desde las áreas de concentración más altas a las más bajas. O sea, el gas CO_2 se mueve desde los capilares al espacio aéreo alveolar, mientras que el O_2 se mueve desde el área alveolar a los capilares. Los valores de referencia de parámetros de gases en sangre en adultos en sangre arterial y venosa son resumidos en la Tabla 25-3. Debido a su mayor solubilidad en agua, el CO_2 se intercambia más rápida y eficientemente que el O_2 . En acidosis respiratoria, este fenómeno de diferencial de gases puede resultar en una PO_2 baja en la sangre, pero una PCO_2 relativamente normal.

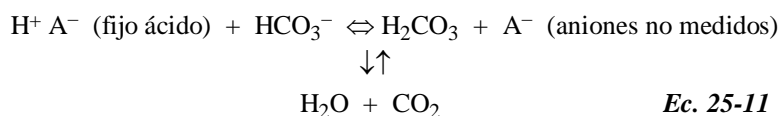
Control de la ventilación.

El control de la ventilación regula el sistema de amortiguación carbónico-bicarbonato que a su vez es regulado por el pH resultante de líquido cefalorraquídeo y el plasma. El control de la ventilación está ubicado en un centro respiratorio del cerebro donde quimiorreceptores son influenciados por el pH del líquido cefalorraquídeo. Otros quimiorreceptores influenciados por cambios en pH de la sangre arterial están ubicados en los vasos carótidos y aorta. Un incremento de $PcCO_2$ en sangre arterial resultará en una caída del pH. Esto a su vez estimulará los quimiorreceptores, iniciándose un incremento en la frecuencia de respiración lo que resultará en una liberación de más CO_2 de la sangre en los pulmones.

Equilibrio ácido-base

El mantenimiento de un pH constante es importante porque los cambios en el pH alterarán el funcionamiento de las enzimas, la recuperación celular y el uso de metabolitos y minerales, la conformación de componentes biológicos estructurales, y la aspiración y liberación de oxígeno.

En el organismo, los amortiguadores fisiológicos actúan para mantener un pH constante de la siguiente manera. Ácidos fijos entran a la sangre y son inmediatamente neutralizados por el sistema de amortiguación de bicarbonato.



Ec. 25-11

Sin embargo, el ácido volátil, CO_2 , es neutralizado por el sistema amortiguador de hemoglobina porque todos los sistemas amortiguadores están en equilibrio unos con otros. Es este equilibrio general lo que le da a la sangre su capacidad relativa de amortiguación descrita en la Tabla 25-1.

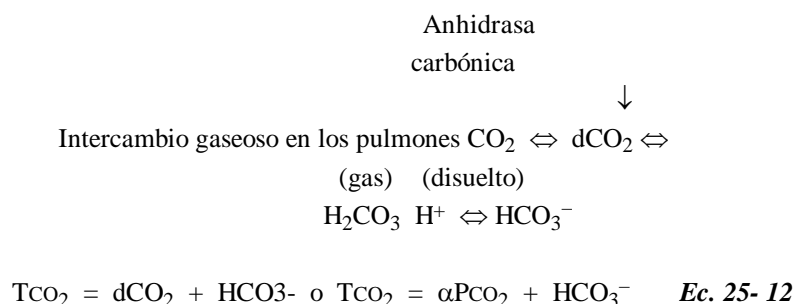
Por lo tanto uno de los sistemas de amortiguación importantes requeridos para mantener el pH de la sangre es el sistema amortiguador ácido carbónico-bicarbonato. Aunque este sistema tiene una relativa baja capacidad de amortiguación (ver Tabla 25-1) sí tiene un papel importante en mantener el pH de la sangre porque actúa como el amortiguador inmediato cuando ácidos fijos entran a la sangre.

Cambios en la frecuencia de respiración alterarán la proporción ácido carbónica-bicarbonato y el pH. Para entender este proceso, uno debe reconsiderar ecuaciones 25-2 y 25-5. Una disminución en la tasa de ventilación causará una disminución en la liberación de CO_2 desde la sangre a los pulmones. Este CO_2 incrementada en la sangre resultará en la formación de más bicarbonato (desplazando la ecuación 25-2 a la derecha) aunque el aumento de bicarbonato será menor que el aumento de PCO_2 . Por lo tanto, habrá una disminución en la proporción bicarbonato-carbonato y un descenso en el pH (vea la ecuación 25-5). Si la tasa de ventilación se mantuviera constante y la liberación metabólica del ácido fijo aumentará, el mismo efecto podría ser observado. En este caso H^+ reacciona con HCO_3^- para formar CO_2 , que es liberado a los pulmones. Existe una disminución inmediata en la concentración de bicarbonato con, esencialmente, ningún cambio en la PCO_2 , resultando en una disminución en la proporción bicarbonato/ αPCO_2 y un pH disminuido. Si aumenta la tasa de ventilación, mas CO_2 es liberado de la sangre en los pulmones y la proporción de ácido carbónico-bicarbonato y el pH aumentan. La tasa de ventilación puede variar desde cero a 15 veces lo normal, permitiendo un grado significativo de regulación de la proporción bicarbonato-carbonico. Por lo tanto, cuando la frecuencia de ventilación es aumentada, ácido en exceso en la forma de CO_2 es retirado rápidamente. Similarmente, cuando la frecuencia de ventilación es disminuida, ácido (CO_2) es agregado para neutralizar el exceso de álcali (HC_3^-).

Otro importante amortiguador de la sangre, hemoglobina, que es vital para la regulación del pH de la sangre, amortigua el CO_2 desde los tejidos. La principal función de la hemoglobina es el transporte del oxígeno a través de la sangre hasta las células del organismo. Existe una relación compleja entre el grado de oxigenación de hemoglobina y el pH, PCO_2 , y CO_2 total (TCO_2) de la sangre. La hemoglobina oxigenada es un ácido más fuerte que la hemoglobina desoxigenada, y por lo tanto, en los pulmones hemoglobina liberará H^+ en la medida en que se oxigena (ecuaciones 25-7 y 25-12), disminuyendo el nivel de bicarbonato y aumentando los niveles de ácido carbónico y su forma anhidra CO_2 , y así aumentado la PCO_2 en la sangre. La velocidad en que procede esta reacción es aumentada enormemente por la presencia de la enzima *anhidrasa carbónica* en las células rojas de la sangre. Es la acción de esta enzima lo que permite la transferencia rápida del CO_2 dentro y fuera de los glóbulos rojos con la consecuente amortiguación por hemoglobina. Este proceso es resumido por la



siguiente serie de reacciones y Fig. 25-3.



En los pulmones la ventilación eliminará esta PCO_2 incrementada al liberar CO_2 desde la sangre y por tanto retornará la proporción de bicarbonato a ácido carbónico a 20.

La hemoglobina oxigenada es transportada en la sangre a las células que tienen una tensión PO_2 relativamente baja y están liberando productos metabólicos, tales como el CO_2 y ácidos orgánicos, en la sangre, así elevando de la PCO_2 y TCO_2 y bajando el pH. La PCO_2 relativamente baja causa la disociación de O_2 de la HbO_2 y la consecuente entrega de O_2 a las células. La alta presión del CO_2 en las células impulsan el CO_2 por gradiente de concentración en los glóbulos rojos. La anhidrasa carbónica convierte rápidamente el CO_2 a H^+ y HCO_3^- (ver Fig. 25-2). La hemoglobina desoxigenada es un ácido más débil que la hemoglobina oxigenada. Neutraliza el H^+ para elevar el pH y origina la reacción de disociación del ácido carbónico para proceder a la derecha y aumentar el nivel de bicarbonato y disminuir la PCO_2 .

La disociación de oxígeno de la hemoglobina como una función de la PCO_2 se muestra en la Fig. 25-4 que es un gráfico del porcentaje de saturación de O_2 de hemoglobina versus PO_2 . La forma sigmoide de la curva indica que a niveles críticos del la PO_2 cerca del P_{50} existe un aumento o disminución fuerte en el porcentaje de saturación de O_2 , con un mínimo desplazamiento de la PO_2 . En el área del organismo donde hay una caída de PO_2 por debajo del P_{50} en la curva sigmoide, la hemoglobina liberará una porción más grande de O_2 que en el nivel de PO_2 por encima de P_{50} . Similarmente, en áreas de O_2 alto tales como los pulmones, la hemoglobina estará esencialmente saturada con O_2 .

Otro factor que tiene efecto en la posición en la curva de disociación del oxígeno es 2,3-difosfoglicerato (2,3 DPG), un intermedio en glicólisis. Al interactuar con grupos amino terminal-N de la molécula de hemoglobina misma, el 2,3 DPG induce la liberación de oxígeno de la hemoglobina. Esto es reflejado en el desplazamiento hacia la derecha de la curva de disociación de O_2 (Fig. 25-4). Con un desplazamiento a la derecha, el nivel crítico de PO_2 que causa una saturación del 50% de hemoglobina por oxígeno es aumentado para que áreas de metabolismo activo, que contienen niveles de 2,3 DPG aumentados, no requieran niveles de PO_2 tan bajos como aquellos requeridos en áreas sin aumento de 2,3 DPG para liberación significativa de O_2 de hemoglobina. Ver el capítulo 36 para detalles adicionales sobre factores que afectan la adhesión de oxígeno por hemoglobina.

Cuanto más oxígeno es liberado en respuesta a niveles aumentados de PCO_2 y H^+ , más hemoglobina desoxigenada que actúa como un amortiguador, es formado. El incremento de



PCO₂ lleva a la formación de bicarbonato (HCO₃⁻). La mayoría de iones H⁺ son adheridos por la hemoglobina desoxigenada, y el resto son amortiguados por los amortiguadores de proteínas y fosfato en el plasma. Debido a que todo el H⁺ formado es amortiguado, no hay esencialmente ningún cambio en el pH. Este fenómeno de amortiguación es referido como el *cambio isohídrico*. El HCO₃⁻ formado en los glóbulos rojos como resultado de la toma de H⁺ por la difusión de hemoglobina fuera de las células y dentro del plasma. Para preservar la neutralidad eléctrica del glóbulo rojo, en la medida en que el HCO₃⁻ distribuye fuera de la célula, el Cl⁻ se difunde en los eritrocitos desde el plasma. Este aumento de Cl⁻ en los eritrocitos es llamado *desplazamiento de cloruro*. Por tanto, la concentración de cloruro en plasma de sangre venosa (donde HCO₃⁻ es formado en los glóbulos sanguíneos) es menor que el de la sangre arterial. Cuando el CO₂ es expulsado de los pulmones, el Cl⁻ de nuevo se desplaza de los glóbulos rojos hacia el plasma (ver Fig. 25-2 y 25-3). Como los aniones de hemoglobina polivalentes son reemplazados por los aniones monovalentes difusores, la osmolalidad del eritrocito aumenta, lo que nos lleva a una difusión de agua en el eritrocito, aumentando ligeramente el promedio del volumen de glóbulos rojos venosos sobre el promedio del volumen celular (MCV) en la sangre arterial.

Aunque el sistema respiratorio intacto actúa como un regulador inmediato de la HCO₃⁻/αPCO₂, el control a largo plazo es ejercido por mecanismos renales (ver Capítulo 26 para detalles). Los riñones excretan ácidos no-volátiles tales como sulfúrico, clorhídrico, fosfórico, y algunos de los ácidos orgánicos en la orina. Los iones de hidrógeno son excretados por los riñones a la orina y son amortiguados por HPO₄²⁻ y amoníaco que es derivado de la deaminación del aminoácido glutamina. Sodio es el catión intercambiado por la excreción de iones de hidrógeno por el riñón. El riñón también es afectado por el sistema amortiguador bicarbonato-carbónico al regular la excreción de bicarbonato (Fig. 25-5). El riñón vuelve a absorber todo el bicarbonato filtrado a concentraciones de bicarbonato en plasma por debajo de 25 mEq/L. Sólo cuando los niveles de bicarbonato se elevan por encima de 25 mEq/L entonces serán excretados a la orina. El bicarbonato reabsorbido es neutralizado por los iones de sodio reabsorbidos que han sido intercambiados por los iones de hidrógeno excretados en la orina. (Fig. 25-5).

Alteraciones del Equilibrio Ácido-Base

Definiciones

Los desórdenes del equilibrio ácido-base son más fácilmente clasificados en base a su causa inmediata. Por lo tanto, acidosis y alcalosis son descritas bien por su origen respiratorio o metabólico.

Estas clasificaciones deben ser siempre consideradas en términos de la ecuación modificada de Henderson-Hasselbalch:

$$\text{pH} = \text{pK}'_{\text{a}} + \log \frac{[\text{HCO}_3^-]}{\alpha\text{PCO}_2} \quad \text{Ec. 25-13}$$

El término αPCO₂ representa el componente ácido que está directamente e

inmediatamente modificado por la condición respiratoria. Por lo tanto, el término αPCO_2 es llamado el *componente respiratorio*. La concentración de bicarbonato es inmediatamente afectada por cambios en la concentración de iones hidrógeno causada por la producción de ácidos metabólicos distintos del CO_2 (o sea, ácidos fijos) y por procesos fisiológicos que cambian directamente la concentración de bicarbonato en suero. Por tanto, la concentración de bicarbonato de plasma es llamado *componente metabólico* del estado ácido-base. Téngase en mente que el pH del plasma depende de la proporción de la concentración de bicarbonato con respecto a αPCO_2 en lugar de la concentración absoluta de estos componentes (ver ecuación 25- 13).

Exceso de base.

Exceso de base es un parámetro calculado que es utilizado para valorar el componente metabólico de la alteración del equilibrio ácido-base del paciente. El término *exceso de base* es utilizado para describir situaciones clínicas donde existe un exceso de bicarbonato (exceso de base positiva) o un déficit de bicarbonato (exceso de base negativa). Usamos el término *déficit de base* para un exceso de base negativa porque este término es una descripción más precisa de la condición fisiológica. El exceso de base en la sangre a un pH de 7.40, PCO_2 de 40 mm Hg, una concentración de hemoglobina de 150 g/L, y una temperatura de 37° C es cero. La concentración de hemoglobina es importante porque la capacidad de amortiguación de la sangre depende en gran parte de la cantidad de hemoglobina. El agregar una base, tal como bicarbonato, eleva el contenido amortiguador de la sangre y resulta en un exceso de base positivo. La pérdida de base, como ocurre en la diarrea o con la adición de ácidos, disminuye el contenido amortiguador de la sangre y resulta en un déficit de base. El cálculo del exceso de base o déficit es útil en el manejo de pacientes con alteraciones en su equilibrio ácido-base porque permite estimar el número de miliequivalentes de bicarbonato de sodio o cloruro de amonio que debe ser administrado para corregir el pH del paciente a normal. En la práctica el exceso de base es solo estimación teórica porque a medida que mejora la condición del paciente, cambios en la respiración y metabolismo invalidarán el cálculo original. Es por esta razón que el estado de gases en la sangre es controlado muy de estrechamente por el análisis de especímenes secuenciales de sangre.

$$\text{Exceso de base} = (1.0 - 0.0143 \text{ Hgb})(\text{HC}_3^-) - (9.5 + 1.63 \text{ Hgb})(7.4 \text{ pH}) - 24 \quad \text{Ec. 25-14}$$

donde Hgb es la concentración de hemoglobina en g/dl.

Saturación de oxígeno.

La *saturación de oxígeno* indica la cantidad de oxígeno llevado por la hemoglobina y es utilizado para determinar la efectividad de la respiración o de la terapia con oxígeno. La saturación de oxígeno es calculada utilizando los parámetros de medición de pH y PO_2 y la ecuación para una curva de disociación de oxígeno normal. Un nomograma para derivar la saturación de O_2 de los valores pH y PO_2 es presentado en la Fig. 25-6. La saturación de oxígeno también es medida directamente mediante el uso de la diferencia en longitud de ondas de máxima absorbancia para hemoglobina oxigenada y desoxigenada. Esta medición es realizada con un cooxímetro. La Tabla 25-3 contiene valores de referencia para los

parámetros calculados para gases en sangre.

Hiato aniónico.

Si el total de cationes medidos son sustraídos del total de aniones medidos como se indica más abajo, la diferencia es la separación de aniones, o cantidad de aniones no medidos presente. O más sencillamente:

$$\text{Separación de aniones} = [\text{Na}^+] + [\text{K}^+] - [\text{Cl}^-] - [\text{HCO}_3^-] \quad \text{Ec. 25-15}$$

Generalmente los únicos electrolitos medidos son el sodio, potasio, cloruro, y bicarbonato (como CO_2 total). Sin embargo, otros aniones existen en la sangre, tales como fosfatos, cetonas, ácido láctico, proteínas y sulfatos. Debido a que estos otros aniones no son medidos, parece haber un exceso aparente, o separación, de cationes medidos sobre aniones medidos. Aumentos en las cantidades de estos aniones no medidos y de los iones Na^+ de iones acompañantes aumentará el hiato aniónico. Generalmente el hiato aniónico tiene un valor medio de 12 mEq/L. El hiato aniónico aumenta con la producción de ácidos orgánicos. La cetoacidosis diabética es la causa más común de un hiato aniónico elevado. Si se descarta la diabetes, deben buscarse otras causas de la acidosis, tales como acidosis láctica, deshidratación, acidosis tubular renal, sepsis, y acidosis tóxica.

Alteraciones por deficiencia de base

Cualquier condición asociada con un pH de sangre más bajo de lo normal (acidemia) es referido como *acidosis*.

Acidosis metabólica.

En desórdenes por deficiencia de base el pH está por debajo del intervalo de referencia. Tales desórdenes ocurren si el proceso metabólico resulta de la acumulación de cantidades anormales de ácidos orgánicos que no sean ácido carbónico. Ejemplos de ácidos que se acumulan son ácido láctico, ácido β -hidroxibutírico y ácido acetoacético. Los ácidos orgánicos metabólicos que entran al plasma reaccionan con bicarbonato del plasma para formar H_2CO_3 que es inmediatamente convertido a gas CO_2 , que a su vez es rápidamente eliminado del organismo por medio de los pulmones. El resultado neto es una inmediata disminución en la concentración de bicarbonato con esencialmente ninguna pérdida de PCO_2 . Esto conlleva a una proporción disminuida de bicarbonato/ αPCO_2 y un pH disminuido, o acidosis metabólica.

En contraste con esta acumulación de ácidos está la pérdida patológica de base del organismo. En diarreas severas, iones de bicarbonato son perdidos como parte de la evacuación con agua, resultando en un déficit de base ($\downarrow[\text{HCO}_3^-]$, \downarrow relación de bicarbonato/ αPCO_2). Estos tipos de desórdenes son clasificados como *acidosis metabólicas*.

Acidosis respiratoria.

Un relativo desorden por deficiencia de base puede resultar de una disminución en la proporción de bicarbonato-ácido carbónico como resultado de un incremento en el ácido carbónico. Esto ocurre si los pulmones no pueden extraer el CO_2 de la sangre. Este desorden



es llamado *acidosis respiratoria*. El aumento en la PCO_2 resulta en un aumento en la concentración de bicarbonato en la medida en que el CO_2 es amortiguado por la hemoglobina.

Sin embargo, el incremento del bicarbonato es menor que el aumento de la PCO_2 , resultando en un relativo déficit de base y una disminución en la proporción bicarbonato/ αPCO_2 , que resulta en un pH sérico por debajo del intervalo de referencia.

Desórdenes por exceso de base

Cualquier condición asociada con el pH de sangre por encima del intervalo de referencia (alcalemia) es una *alcalosis*.

Alcalosis metabólica.

En desórdenes por exceso de base, el pH está por encima del intervalo de referencia. Si el desorden es causado por un aumento de bicarbonato, con un pequeño o ningún cambio en el ácido carbónico, el desorden es llamado alcalosis metabólica. Tal desorden ocurre cuando cantidades excesivas de bicarbonato de soda son ingeridos o administrados o cuando hay un aumento en la reabsorción renal de bicarbonato, como en alcalosis hipocloremica.

Alcalosis respiratoria.

Si el desorden es causado por una disminución de ácido carbónico, como cuando la respiración es sobre estimulada, el desorden es llamado *alcalosis respiratoria*. En esta condición, una ventilación rápida disminuye grandemente la PCO_2 en la sangre, con un cambio mínimo de la concentración de bicarbonato. Esto resulta en un exceso de bicarbonato así que la proporción de bicarbonato/ αPCO_2 aumenta. Esta relación aumentada causa un elevado pH plasmático.

Instrumentación (ver también págs. 320 y 477-480)

El analizador tradicional de gases en sangre de laboratorio incluye un electrodo de pH, un electrodo de PO_2 y uno de PCO_2 . Como la atención en la cabecera del paciente ha ganado aceptación, el uso de electrodos no-invasivos se ha expandido. La tecnología actual permite una evaluación fiable de ambos, PO_2 y PCO_2 utilizando técnicas no invasivas pero *no* pH en sangre. Tales aparatos no invasivos utilizan esencialmente los mismos electrodos que el analizador tradicional de gases en sangre. Son ampliamente utilizados en unidades de cuidados intensivos neonatales porque no requieren la toma de sangre de estos infantes pequeños. Es una práctica común el verificar el rendimiento de estos instrumentos no invasivos realizando periódicamente las pruebas tradicionales de gases en sangre.

Con el desarrollo de microelectrodos desechables y analizadores completamente automatizados que son muy fiables, el análisis de gases en sangre ahora están siendo realizados en la sala de operaciones y otras áreas que no son laboratorios, obteniéndose resultados en tiempos más cortos y permitiendo una intervención médica más rápida.

El laboratorio central es generalmente el responsable del mantenimiento los aparatos, mientras que el operador, médico, o terapeuta respiratorio es el responsable del control de calidad. Se requiere documentación sobre el adiestramiento del operador.

Parámetros calculados.



El resto de los parámetros del equilibrio ácido-base de la sangre no son medidos sino, en su lugar se calculan utilizando las ecuaciones 25-6 y 25-13. Uno de los parámetros es el bicarbonato, que es calculado mediante el uso de los parámetros medidos pH y PCO_2 en la ecuación Henderson-Hasselbalch:

$$\text{HCO}_3^- = [\alpha\text{PCO}_2] \text{ antilog } [\text{pH} - \text{pK}'_a] \quad \text{Ec. 25-16}$$

Nomogramas también han sido desarrollados para calcular los niveles de mediciones de bicarbonato a partir de pH y PCO_2 (Fig. 25-7). Los niveles de bicarbonato son útiles en la evaluación del grado en el cual el control metabólico y renal están involucrados en el estatus ácido-base del paciente.

Acidosis

Acidosis metabólica

Etiología. Producción de ácido orgánico en aumento resultando en acidosis metabólica puede tener muchas causas. La diabetes no controlada resulta en la acumulación de los ácidos acetoacético e hidroxibutírico que son producidos por una oxidación excesiva de ácidos grasos (ver Capítulo 33). El ayuno o las dietas caprichosas también producen niveles aumentados de estos ácidos.

El ácido láctico se eleva como resultado de aumentos en el metabolismo anaeróbico causado por ejercicio muscular intenso o infecciones sistémicas. La acidosis láctica también resulta de hipoxia local tisular (tejido bajo en PO_2) que es causada por deshidratación, perfusión pobre como resultado de colapso circulatorio, o fallo cardíaco.

La acidosis tubular renal resulta de una falla del riñón para acidificar la orina al intercambiando H^+ por Na^+ . Esta insuficiencia renal es adquirida como resultado de infección o es congénita, como en los casos de síndrome Toni-Fanconi severo. Enfermedades del hígado que dificultan la formación de urea y amoníaco también resultará en una acidosis metabólica debido a la retención de H^+ .

La intoxicación por salicilatos inicialmente induce alcalosis respiratoria debido a hiperventilación, que es un resultado del efecto estimulante de la droga sobre el centro respiratorio. La droga ingerida es convertida a un ácido antes de la excreción, y las grandes cantidades de ácido formado al final resultan en acidosis metabólica. Otros venenos que son ingeridos como ácidos o compuestos que producirán metabolitos ácidos son el metanol (convertido a ácido fórmico) etilenglicol de glicol (convertido a ácido oxálico), paraldehído, y cloruro de amonio. Estos compuestos inicialmente causan alcalosis respiratoria seguido de acidosis metabólica. La infusión de grandes cantidades de cloruro de sodio isotónico resulta en una acidosis metabólica debido a la alta carga de sodio que compite con los iones de hidrógeno para la excreción renal. La acidosis metabólica también es causada por la ingestión de inhibidores de anhidrasa carbónica, tales como acetazolamida o sulfonamidas, que interfieren con la formación de bicarbonato en los eritrocitos y células del túbulo renal (ver Figs. 25-2, 25-3 y 25-5).

Una acidosis metabólica también puede ser causado por una concentración disminuida de bicarbonato. Diarrea y colitis producen pérdidas de fluidos intestinales, que contienen altas concentraciones de bicarbonato. La resultante reducción en la proporción de $\text{HCO}_3^-/\text{H}_2\text{CO}_3$



causa la acidemia.

Respuesta fisiológica. Las acidosis descritas arriba generalmente resultan de la presentación al organismo de una carga de ácido que es compensada por lo menos en parte por la retención de bicarbonato. Cuando ocurre la acidemia como resultado de una acidosis metabólica aguda, el organismo intenta corregir esta acidemia por hiperventilación. La hiperventilación disminuye la PCO_2 y en menor grado el HCO_3^- , y al menos parcialmente aumenta la proporción de HCO_3^-/H_2CO_3 , retornando el pH a la normalidad. Este mecanismo de corrección para el pH durante la acidosis es conocido como *alcalosis respiratoria compensatoria*. El resultado es una disminución en la PCO_2 y concentración de HCO_3^- y un valor de pH más cercano al intervalo de referencia. En una acidosis metabólica que no involucra disfunción renal, el riñón excretará ácidos orgánicos e intercambiará H^+ por Na^+ en la región distal del conducto, resultando en una orina más ácida. Este mecanismo de compensación renal se hace efectivo tras un periodo de tiempo y eventualmente corregirá tanto el pH de la sangre como el bicarbonato hacia los intervalos de referencia. Esta corrección puede tener lugar sólo cuando la causa de la acidosis haya sido eliminada. Parte de la respuesta renal a la acidosis crónica es la excreción de amoníaco por las células túbulo renal. Esta excreción de amoníaco hacia la orina permite que un sean excretados H^+ adicionales y por tanto reduce la carga de H^+ en la sangre.

Datos de laboratorio. Los hallazgos vistos en acidosis metabólica, resumidos en la Tabla 25-4, incluyen una disminución de pH y HCO_3^- . Inicialmente la PCO_2 puede estar dentro del intervalo de referencia pero disminuirá como resultado de la respuesta respiratoria a la acidemia. Un déficit de bases (exceso de base negativo) también estará presente.

Los resultados de laboratorio en acidosis láctica son aquellos de acidosis metabólica con un pH disminuido, una PCO_2 y PO_2 inicialmente normales, un O_2 con saturación disminuida (la curva de saturación de hemoglobina es desplazada a la derecha), un bicarbonato y un CO_2 total disminuido, un hiato aniónico aumentado, un exceso de base negativa, una concentración de ácido láctico y potasio aumentada. En la medida en que el organismo trata de corregir la acidosis metabólica, la PCO_2 disminuye.

En casos de ingestión de drogas tóxicas, tales como metanol, etilenglicol o envenenamiento por paraldehído, el paciente desarrolla una acidosis metabólica. Los resultados de laboratorio incluyen un pH disminuido, un PCO_2 y PO_2 inicialmente normal, una disminución de saturación O_2 disminuida, bicarbonato, y CO_2 total, un aumento del hiato aniónico (causado por los venenos ingeridos) y un exceso de base negativo. En la medida en que el organismo intenta compensar la acidosis, la PCO_2 disminuye inicialmente y el bicarbonato aumenta ligeramente hacia la normalidad mientras que el riñón reabsorbe las cantidades crecientes de bicarbonato.

Tratamiento. Inicialmente la causa de la acidemia debe ser corregida si es posible, por ejemplo, mediante tratamiento con insulina de la diabetes. Si el pH cae por debajo de 7.2 existe a veces un efecto nocivo sobre el sistema cardiovascular, y el déficit de base tendrá que ser corregido inmediatamente. Esto se logra frecuentemente mediante la administración de bicarbonato, que corrige el déficit de base al incrementar la proporción HCO_3^-/H_2CO_3 . En todos casos, finalmente, la causa de acidosis metabólica debe ser corregida.

Acidosis respiratoria

Etiología. La acidosis respiratoria es causado por desórdenes que interfieren con la capacidad normal de los pulmones para expeler CO_2 . Estos desórdenes incluyen edema pulmonar, broncoconstricción, neumonía, enfisema, apnea, y bradicardia. La inyección de morfina y el envenenamiento por barbitúricos causan una inmediata depresión respiratoria, resultando en acidosis respiratoria.

El síndrome de estrés respiratorio, que es común en niños prematuros, resulta en una acidosis respiratoria porque los infantes carecen de suficientes niveles de surfactante en sus pulmones para permitir que el alveolo se expanda en su forma usual. El intercambio de gases está por tanto restringido. El estrés respiratorio es también visto en algunos adultos quienes sufren un shock sistémico o toxicidad por oxígeno. Inicialmente los parámetros de gases en sangre son un pH disminuido, PCO_2 incrementada, PO_2 disminuida, y saturación de oxígeno disminuido. Exceso de base, bicarbonato, e hiato aniónico están inicialmente dentro de los límites normales.

Respuesta fisiológica. La respuesta fisiológica a la acidosis respiratoria incluye un aumento en la excreción de ácidos renales, la retención de sodio y bicarbonato, y si es posible, hiperventilación. Si una respuesta compensa la acidosis respiratoria y resulta en su corrección, la acidosis es referida como acidosis respiratoria compensada. Esta respuesta puede llevar al desarrollo de alcalosis metabólica que compensa la acidosis respiratoria. En acidosis respiratoria crónica, el pH se hace esencialmente normal pero un exceso de base permanece. Cuando el desorden respiratorio es corregido, la respuesta respiratoria usual a la acidosis elimina el exceso de CO_2 , pudiendo originar una alcalosis metabólica transitoria puede resultar. Generalmente, esta alcalosis no requiere tratamiento.

Datos de laboratorio. Desórdenes respiratorios frecuentemente producen un aumento en la concentración de CO_2 en plasma con un incremento pequeño en HCO_3^- , y una disminución concurrente en la proporción de $\text{HCO}_3^-/\text{H}_2\text{CO}_3$ que resulta en acidosis respiratoria. Sin embargo, como resultado de los bajos niveles de oxígeno en los tejidos, una acidosis láctica metabólica coexistente puede desarrollarse. Esta acidosis metabólica resulta en un hiato aniónico aumentado y la disminución de bicarbonato resulta en un exceso de base negativo. La Tabla 25-4 es un resumen de estos hallazgos.

Como resultado de una respuesta compensatoria renal, es con frecuencia encontramos concentraciones muy altas de HCO_3^- con un pH casi normal. En enfermedades respiratorias crónicas la concentración de HCO_3^- y pH son casi normales, aunque la PO_2 pueda estar deprimida.

Tratamiento médico. El tratamiento médico va dirigido primariamente hacia la corrección del desorden respiratorio y ventilación del paciente con gases que contengan una PO_2 más alta y una PCO_2 más baja, mediante el uso de respiradores mecánicos. Sin embargo, la corrección inicial de la acidemia se puede lograr por medio de inyección de bicarbonato de sodio.

Alcalosis

Alcalosis metabólica

Etiología. Ocasionalmente, una excesiva crónica ingestión de bicarbonato de soda para el malestar gastrointestinal resulta en una concentración aumentada de bicarbonato en la sangre que resulta en una alcalosis metabólica. Similarmente, el tratamiento de úlceras

pépticas con ingestión de grandes cantidades de antiácidos alcalinos también producirán alcalosis metabólica. Más comúnmente, alcalosis metabólica surge de la pérdida de cloruro. Vómitos prolongados o la aspiración de fluidos gástricos llevan a pérdida de ácidos hidroc্লóricos gástricos. Esto a su vez, eleva el pH de la sangre debido a la pérdida de aniones cloruro lo que resulta en un aumento de la retención renal de bicarbonato para contrarrestar el sodio reabsorbido por el túbulo proximal. Esta condición es conocida como *alcalosis hipoclorémica*. La administración de corticosteroides y enfermedades tales como hiperaldosteronismo y síndrome de Cushing, que afectan la capacidad del riñón para regular el equilibrio de electrolitos, también elevarán el pH de la sangre. En el túbulo distal, el Na^+ es retenido a expensas de K^+ y H^+ . La hipocalemia resultante origina liberación de K^+ por las células hacia la sangre y un movimiento concurrente y equilibrado de H^+ desde la sangre hacia las células, logrando así una elevación en el pH de la sangre.

Respuesta fisiológica. Para compensar el aumento en la proporción del $\text{HCO}_3^-/\text{H}_2\text{CO}_3$, durante la alcalosis metabólica, la función respiratoria disminuye, elevando la PCO_2 y la concentración de bicarbonato en la sangre. La PCO_2 se eleva más rápidamente que el HCO_3^- , por tanto disminuye el pH. Este mecanismo de reajuste del pH durante la alcalosis metabólica es llamado acidosis respiratoria compensatoria. El resultado es un pH más cercano al intervalo de referencia en presencia de una elevada concentración de HCO_3^- .

Si la alcalosis persiste, el organismo intentará corregir el alcalosis aumentando la excreción renal del exceso de bicarbonato a menos que el túbulo proximal del riñón aumente la reabsorción de bicarbonato, como en la hipocalemia, deshidratación, o hipocloremia.

Datos de laboratorio. Durante la alcalosis metabólica, la proporción de $\text{HCO}_3^-/\text{H}_2\text{CO}_3$ aumenta como resultado de la elevación de la concentración de bicarbonato en la sangre. Debido a la respuesta fisiológica a la alcalemia, resultados adicionales de laboratorio son de una PCO_2 aumentado y la orina alcalina que contiene bicarbonato titulable. (Tabla 25-4).

Tratamiento. El tratamiento de la alcalosis metabólica involucra la administración de NaCl o KCl , dependiendo del grado de hipocalemia, y quizás también la administración de NH_4Cl si la alcalosis es severa y persistente. El anión Cl^- de NH_4Cl compensa por el déficit de cloruro, que pudo haber causado inicialmente la excesiva retención de bicarbonato. Esto permite al riñón iniciar la excreción del exceso de bicarbonato y corregir la alcalosis.

Alcalosis respiratoria

Etiología. La hiperventilación causa la alcalosis respiratoria. Las situaciones que resultan en hiperventilación incluyen histeria, llorar excesivamente, gestación, intoxicación por salicilatos, defecto en el sistema nervioso central para controlar el sistema respiratorio, asma, fiebre, embolismo pulmonar, y uso excesivo de un respirador mecánico.

Respuesta fisiológica. Los riñones responden a la alcalosis expulsando cantidades aumentadas de bicarbonato bajo las condiciones de una PCO_2 disminuida que ocurre durante la alcalosis respiratoria. En respuesta a la alcalosis el túbulo proximal del riñón disminuye la reabsorción de bicarbonato. Esta respuesta renal a la alcalosis respiratoria es llamada *acidosis metabólica compensatoria*.

Datos de laboratorio. La hiperventilación lleva a una mayor pérdida de en aumento de CO_2 de la sangre en nivel de la superficie alveolar, que causa que la proporción del



$\text{HCO}_3^-/\text{H}_2\text{CO}_3$ aumente en la medida en que el ácido carbónico se pierde. Debido a la respuesta fisiológica a la alcalemia, resultados adicionales del laboratorio incluyen un PO_2 disminuida y orina alcalina que contiene titulable. (Tabla 25-3).

Tratamiento. La alcalosis respiratoria se corrige bajando el ritmo respiratorio con drogas, tales como sedantes, o hacer que el paciente inhale aire con un contenido más alto de CO_2 . Esto se logra fácilmente al hacer que el paciente respire en un ambiente restringido, como una bolsa de papel, que eleva la PCO_2 del aire y en la sangre. Esta PCO_2 incrementada retorna la proporción $\text{HCO}_3^-/\text{H}_2\text{CO}_3$ dentro del intervalo de referencia y corrige la alcalosis respiratoria. La Tabla 25-4 resume los cambios en los parámetros de gases en sangre observados en varias enfermedades.

Cambio del Compuesto Analizado en la Enfermedad (Tabla 25-5)

La cetoacidosis diabética en pacientes con diabetes no controlada es un ejemplo de acidosis metabólica. Los datos de laboratorio incluyen una disminución del pH, acidemia, un descenso de la PCO_2 , una PO_2 normal, una saturación disminuida del O_2 (ver p. 477 para métodos gases en sangre) una disminución de bicarbonato y de CO_2 total (ver p. 480, TCO_2), un hiato aniónico aumentado, un exceso de base negativo, y aumento de potasio en suero, cetonas (ver p. 632) y ácidos láctico y pirúvico (ver p. 481-482) causado por alteración del metabolismo carbohidrato y graso.

En enfisema es una enfermedad que dificulta la respiración, que frecuentemente cursa con acidosis respiratoria. Informes de laboratorio incluyen un pH y PO_2 disminuidos, un PCO_2 y potasio aumentados, y una disminución en la saturación de oxígeno. Inicialmente el hiato aniónico, exceso de base, bicarbonato y TCO_2 están dentro del intervalo de referencia. En la medida en que el organismo compensa la acidosis, el bicarbonato y TCO_2 también se elevan. Como en el síndrome de estrés respiratorio, una PO_2 disminuida podrá resultar en una acidosis metabólica causada por la elevación del lactado en la sangre debido a un metabolismo anaeróbico aumentado.

Hemoglobinopatías, tales como anemia de células falciformes, pueden llevar a una cinética no usual de saturación de oxígeno causada por la anormal molécula de hemoglobina. Algunos informes de saturación asociados con hemoglobinopatías son una disminución en la saturación de oxígeno y niveles de PO_2 , que resultan en un metabolismo anaeróbico aumentado y por lo tanto acidosis metabólica. Persistencia de la hipoxemia resulta en bicarbonato y CO_2 total disminuido, un hiato aniónico aumentado (ver p.457), y lactato en sangre, y un exceso de base negativo. La respuesta respiratoria a esta acidosis es la hiperventilación, que disminuye la PCO_2 . La respuesta renal a esta acidosis es un aumento en la reabsorción del bicarbonato, que tiende a retornar la proporción $\text{HCO}_3^-/\text{H}_2\text{CO}_2$ a lo normal.

El fallo renal lleva a la acidosis metabólica con los siguientes datos de laboratorio asociados: un pH disminuido, inicialmente una PCO_2 y PO_2 normales, saturación de oxígeno disminuida, nivel de potasio aumentado, y nivel de bicarbonato y TCO_2 disminuido. En la medida en que el hiato aniónico aumenta debido a la producción de y retención de ácido orgánico, el exceso de base también se convierte en negativo. La compensación respiratoria para la acidosis metabólica llevará eventualmente a una disminución en la PCO_2 .



Métodos de Análisis

Análisis de gases en sangre y saturación de oxígeno

John E. Sherwin

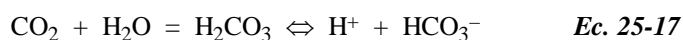
Principios de análisis y uso corriente.

La evaluación del estado de ácido-base de un individuo se basa en la medición del pH de la sangre, PCO_2 , y PO_2 . La medición de estos parámetros también permite el cálculo de una variedad de otros índices, incluyendo contenido de oxígeno, saturación de oxígeno, CO_2 total, bicarbonato y exceso de base que refleja el estado metabólico y de oxigenación de un individuo.

Los sistemas de medición modernos por medio de electrodo comprenden un electrodo de vidrio, un electrodo de referencia, y una unión líquida entre los dos electrodos (Fig. 25-8). El electrodo de referencia sirve como una fuente de potencial de referencia que está en contacto con la solución desconocida. Los electrodos de referencia comúnmente utilizados son el electrodo de plata-cloruro plata y el electrodo de calomel. El electrodo de calomel saturado es probablemente el más común. El electrodo de calomel comprende un tubo de vidrio que contiene pasta de calomel (cloruro mercurioso, Hg_2Cl_2 y mercurio, Hg) y una solución saturada de cloruro de potasio (KCl). La solución KCl está saturada o mantenida a una alta concentración lo suficiente como para que la composición iónica de la sangre que está en contacto con el electrodo no altere el potencial eléctrico constante del electrodo de referencia. Un alambre de platino se extiende dentro de la solución del calomel.

El potencial del electrodo de vidrio varía con los cambios en el pH. Los iones de hidrógeno de la muestra de sangre se intercambiarán con iones metálicos de la membrana de vidrio. La capa de vidrio del electrodo debe ser hidratada para que el electrodo funcione adecuadamente. La capa de vidrio hidratado continuamente se disuelve desde la superficie a medida que el vidrio seco resulta hidratado. El interior del electrodo de vidrio está lleno con una solución de un pH constante que está en contacto con la membrana del vidrio. Un alambre de plata-cloruro de plata en contacto con la solución de pH constante se conecta a un voltímetro. Los iones de hidrógeno presentes en la sangre que hagan contacto con el electrodo de vidrio cambian el potencial de este electrodo con respecto al electrodo de referencia. Este cambio en potencial eléctrico es registrado por el voltímetro y relacionado con el pH del espécimen de la sangre.

El electrodo de pH puede ser modificado y utilizado para medir el PCO_2 de la sangre. Las modificaciones incluyen colocar el electrodo de vidrio en una solución amortiguadora débil de bicarbonato y evitar que este amortiguador entre físicamente en contacto directo con el espécimen de sangre mediante el uso de una membrana permeable al gas. El dióxido de carbono presente en la sangre difundirá a través de la membrana permeable al gas en la solución amortiguadora de bicarbonato donde puede reaccionar con agua en la siguiente secuencia de reacciones.



El cambio en la concentración de iones de hidrógeno es medido por el mismo sistema

utilizado para medir el pH de un especimen de sangre, como se ilustra en la Fig. 25-9. Los iones de hidrógeno presentes en la muestra de sangre no afectan el pH dentro del sistema amortiguador de bicarbonato porque los iones de hidrógeno no penetran la membrana de gas permeable.

La medición de la presión parcial de oxígeno, o PO_2 , en un especimen de sangre es logrado con el uso de un electrodo polarográfico Clark (Fig. 25-10). El electrodo de Clark consta de un ánodo de plata y un cátodo de platino inmerso en un amortiguador electrolito. La solución amortiguadora consiste de cloruro de potasio y tampón fosfato, o hidróxido de potasio amortiguado, en agua. El potencial eléctrico del cátodo es mantenido constante con respecto a del ánodo. El oxígeno presente en la muestra de sangre difunde a través de la membrana de gas permeable dentro del amortiguador electrolito donde es reducido el cátodo de platino como sigue:



La reducción de oxígeno en el cátodo resulta en el flujo de corriente entre el cátodo y el ánodo. La cantidad del flujo de corriente es medido y relacionado con la cantidad de oxígeno presente en la muestra.

La calibración de un electrodo PO_2 y PCO_2 se puede realizar bien a través de un gas que fluye o una muestra líquida que haya sido equilibrada con gas. Los gases utilizados para calibración de instrumentos son generalmente burbujeados a través de humidificadores a $37^\circ C$ para saturar los gases con vapor de agua. Es necesario saturar los gases con vapor de agua es necesario para eliminar el problema de tratar de mantener gas totalmente “seco” para calibración de instrumentos. Cualquier humedad residual que se encuentre presente en la cámara de medición contaminará un gas seco al introducir vapor de agua en el gas. El vapor de agua ejerce su propia presión parcial y por lo tanto reducirá las presiones parciales de otros gases en la mezcla en una cantidad proporcional. Por ejemplo, un gas que es saturado con agua a $37^\circ C$ tendrá una presión parcial de 47 mm Hg debido al vapor de agua. Por lo tanto, para producir consistentemente una mezcla de gas con presiones parciales conocidas de O_2 y CO_2 y para eliminar el posible error asociado con el mantenimiento de un gas de calibración “seco”, el gas es saturado con agua antes de calibrar el instrumento.

Sin embargo, el uso de un gas para la calibración de instrumentos si tiene sus desventajas. La velocidad del flujo de gas a través de una cámara de medición debe estar estrictamente controlada debido a que las variaciones en la velocidad del flujo pueden afectar el enfriamiento del electrodo y resultará en una saturación incompleta del gas con vapor de agua. Estos dos factores pueden afectar adversamente la calibración del instrumento. Otro problema al usar este tipo de calibración tiene que ver con la diferencia de matrices entre el calibrador de gas y la muestra del paciente que es un líquido.

Otro esquema de calibración para analizadores de gases en sangre hace uso de un líquido amortiguado con gas tonometrado para calibración. El uso de calibradores líquidos ofrece la ventaja de que tienen matrices similares a la muestra analizada, la calibración es independiente de la velocidad del flujo de gas, y no hay que tener en cuenta la saturación del gas con vapor de agua. Cuando se utiliza de calibración por líquido, una desviación positiva de aproximadamente 5 a 8% tanto para PCO_2 como PO_2 podrá ser observada, comparado con



el uso del calibrador de gas.

Además del análisis de especímenes de sangre para análisis de PCO_2 y PO_2 , también han sido desarrolladas técnicas no invasivas transcutáneas para la medición de estos parámetros. Las mediciones transcutáneas de PCO_2 y PO_2 hacen uso de la misma tecnología que aquellas utilizadas para especímenes de sangre, aunque con pequeñas modificaciones. Mediciones transcutáneas de PCO_2 y PO_2 hacen uso de una pequeña cantidad de difusión de gases del lecho capilar en la piel hasta la superficie de la piel. Esta difusión de gas desde de la capa capilar puede ser aumentada al calentar la piel a 42° o 43° C para aumentar el flujo local de sangre. Con flujo de sangre máximo, la PO_2 medida en la superficie de la piel correlaciona muy bien con la PO_2 arterial. Para la PCO_2 medida transcutáneamente, la temperatura aumentada necesaria para maximizar el flujo de sangre también aumenta el metabolismo dentro del tejido calentado, y esto resulta de la aumento del PCO_2 . Además, en contraste con el electrodo de PO_2 , que consume oxígeno en el proceso de su reducción a peróxido e iones hidróxido, el electrodo PCO_2 no consume ni elimina la PCO_2 que difunde a través de la superficie de la piel. Por lo tanto, la PCO_2 es más alta en la superficie del electrodo que en el área capilar más cercano a la superficie de la piel. Los efectos adversos de temperatura y colocación de electrodo hacen necesario el uso de un factor de corrección para compensar por estos factores en mediciones de PCO_2 .

Mediciones de pH y PO_2 permiten el cálculo del porcentaje de hemoglobina que está saturado con oxígeno.^{ref(506)} El porcentaje de saturación de oxígeno es el porcentaje de la hemoglobina total que tiene O_2 unido a ella. El porcentaje de saturación de oxígeno también puede ser cuantificado con la medición directa de la diferencia entre los perfiles de absorción espectral de la hemoglobina oxigenada y de la hemoglobina desoxigenada. Para una medición directa del porcentaje de saturación, la hemoglobina es medida a dos longitudes de onda. La primera longitud de onda elegida es una en la que una gran diferencia de absorbancia ocurre entre las formas oxigenadas y desoxigenadas de hemoglobina (tal como 600 o 577 nm). La segunda longitud de onda es elegida del punto isobéptico. El punto isobéptico es la longitud de onda (tal como 506 o 548) en que las absorbancias para las formas oxigenadas y desoxigenadas de hemoglobina son idénticas. La absorbancia en el punto isobéptico indica la cantidad total de hemoglobina presente, donde la absorbancia en la otra longitud de onda indica la diferencia en la concentración de formas oxigenadas y desoxigenadas de la hemoglobina. La fórmula utilizada para calcular el porcentaje de saturación de oxígeno es la siguiente:

Porcentaje de saturación de O_2 =

$$K_2 \times \frac{\text{Absorbancia a la primera longitud de onda}}{\text{Absorbancia al punto isobéptico}} - K_1 \times 100\%$$

Ec. 25-19

donde K_1 y K_2 son constantes derivados del paso de luz y los coeficientes de extinción molar para hemoglobina oxigenada y desoxigenada.

Especimen.

Tres diferentes tipos de especímenes, arterial, venosa y capilar, pueden ser utilizadas

para determinaciones de gases en sangre. La sangre puede ser obtenida bien con jeringas o con tubos capilares. Tanto vidrio como material plástico puede ser utilizado. Jeringas y tubos capilares de vidrio son más adecuados para la obtención de la muestra, almacenaje y transporte de especímenes comparado con envases de plástico. Una jeringa de vidrio bien tapada o tubo capilar de vidrio bien tapado está a prueba de fugas de gas por lo menos durante 2 horas.[refs\(507\)](#) [refs\(508\)](#) Envases plásticos son permeables a los gases y podrán desviar los valores de la PO_2 y PCO_2 hacia los valores correspondientes de la atmósfera ambiental.[refs\(509\)](#) La magnitud de este cambio depende del espesor de la pared de la jeringa, la relación superficie:- volumen y por el correcto ajuste del embolo y tapón de la jeringa. Jeringas de plástico son completamente adecuadas para la colección de especímenes para análisis de gases en sangre si el tiempo de almacenaje no es mayor de 30 minutos.[ref\(510\)](#)

A pesar del tipo de recipiente utilizado, varios requerimientos claves deben ser cumplidos para una medición exacta de gases en la sangre. Las muestras deben ser coleccionadas y manipuladas sin contacto con el aire (anaeróticamente) para evitar el equilibrio de parámetros de gases en sangre con la atmósfera. También, la muestra debe ser adecuadamente anticoagulada. Insuficientes anticoagulante o mezcla de muestras permitirán la formación de coágulos de fibrina, que pueden interferir con la función de los instrumentos, mientras que una cantidad excesiva de anticoagulante puede dar información incorrecta. Una PCO_2 aumentada y un pH disminuido. Si hay un retraso de más de 5 minutos entre la obtención de muestras y el análisis la muestra debe ser preservada en agua helada.

Intervalos de referencia.

Los intervalos de referencia para pH, PO_2 y PCO_2 , el porcentaje de saturación de oxígeno a 37° C para sangre arterial y venosa son como sigue:

	Arterial	Venosa
pH	7.35–7.45	7.33–7.34
PCO_2	35–45 mm HG	38–50 mm Hg
PO_2	80– 00 mm Hg	30–50 mm Hg
Saturación O_2 (%)	95-100%	60–85%

Anhídrido carbónico

W. Gregory Miller

William J. Korzun

Principios de análisis.

El total de anhídrido carbónico en suero o plasma consiste de CO_2 disuelto, CO_2 unido débilmente a grupos de amino de proteínas de plasma, y anion bicarbonato (HCO_3^-). Otras formas cuantitativamente menores incluyen ácido carbónico (H_2CO_3) e iones carbonato (CO_3^{2-}). Ya que el bicarbonato por sí constituye la mayoría del anhídrido carbónico total presente en plasma, la medición del anhídrido carbónico es útil primariamente para indicar la concentración de bicarbonato.



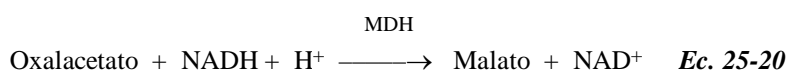
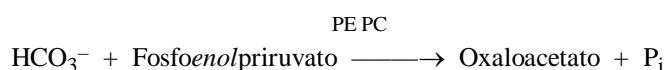
Los procedimientos para cuantificar el contenido total de anhídrido carbónico en suero o plasma pueden ser de dos tipos. En el primero, la acidificación de la muestra convierte todas las formas de anhídrido carbónico en CO₂ gas. La medición de la cantidad de gas formada es proporcional al contenido de CO₂ total. El otro procedimiento para la medición del total de anhídrido carbónico involucra las reacciones enzimáticas de bicarbonato con fosfoenolpiruvato carboxilasa acoplado a la reacción de un indicador que es controlado espectrofotométricamente.

El método de referencia histórico para CO₂ es el método manométrico utilizando el microgasómetro de Natelson (Tabla 25-6, método 1).^{ref(511)} La muestra es colocada en un sistema cerrado y el CO₂ y otros gases presentes son liberados después de la acidificación. La presión ejercida por los gases en el sistema cerrado es medida. El gas CO₂ luego es absorbido por álcali y la presión residual causada por los gases que no son CO₂ son medidos. La diferencia de presiones después de la acidificación y después de la absorción del CO₂ por álcali es atribuible al contenido de CO₂ en la muestra.

Otro método más viejo, casi en desuso, para la determinación de anhídrido carbónico es el análisis de flujo continuo (Tabla 25-6, método 2).^{ref(512)} El gas CO₂ es liberado de la muestra por acidificación del flujo de la muestra. El CO₂ gaseoso difunde a través de una membrana de goma-silicona, disolviéndose en un tampón alcalino de bicarbonato que contiene un colorante indicador de pH (fenolftaleína o rojo de cresol). El CO₂ disuelto es convertido a bicarbonato e iones de hidrógeno produciendo un cambio en el pH que resulta en un cambio en la intensidad del color del indicador. El aumento en color es determinado espectrofotométricamente y es proporcional al contenido de CO₂ en la muestra. Debido a que otros gases disueltos en el suero no producen un cambio en pH, estos no interfieren.

Un método utilizado comúnmente para determinaciones del CO₂ emplea un electrodo para CO₂ para cuantificar el gas CO₂ producido después de acidificación de la muestra (Tabla 25-6, método 3). Este método similar al análisis de flujo continuo, hace difundir el gas CO₂ a través de una membrana de goma-silicona luego disolviéndose en un tampón. Esto resulta en un cambio en el pH de un tampón de electrodo de bicarbonato. Sin embargo, el pH no es detectado por un tinte indicador de pH, sino en su lugar, el cambio en pH es detectado por un electrodo de vidrio de pH dentro del compartimento del electrodo de CO₂ (ver p. 478).

Otro método común utilizado para medir el anhídrido carbónico total está basado en una prueba enzimática y espectrofotométrica. Este método ha sido adaptado a muchos analizadores automáticos. Todas las formas de CO₂ son convertidas a HCO₃⁻, después de agregar álcali al suero. El HCO₃⁻ es luego enzimáticamente convertido a ácido oxaloacético, que a su vez, es reducido a malato por NADH. La reducción en la concentración de NADH, controlada a 340 nm, está directamente relacionada a la concentración de bicarbonato en el espécimen (Tabla 25-6, método 4).





PEPC es fosfoenolpiruvate carboxilasa, P_i es fosfato inorgánico, y *MDH* es malato deshidrogenasa.

El CO_2 total también puede ser calculado a partir de la medición de pH y PCO_2 durante un análisis de gases en sangre (Tabla 25-6 método 5). Aunque este cálculo puede suministrar solo una estimación del CO_2 total no-medido, es el frecuentemente ejecutado por muchos analizadores de sangre. La correlación entre el CO_2 total calculado y el medido es generalmente bueno, [ref\(513\)](#)

Especimen.

Suero o plasma heparinizada son especímenes aceptables para el análisis del CO_2 total. Sangre venosa tomada en un tubo de vacío es el especimen usual, aunque también puede ser utilizada sangre capilar. Otros anticoagulantes no pueden ser utilizados porque alteran el equilibrio entre el CO_2 de eritrocitos y plasma. También disminuyen el pH de la muestra y aceleran la pérdida de CO_2 hacia el aire ambiental. Sangre entera no puede ser utilizada porque el CO_2 unido al hemo y el CO_2 unido a carbamino varía con el hematocrito y saturación de oxígeno produciendo resultados variables.

Intervalos de referencia.

Los intervalos de referencia listados están basados en el procedimiento manométrico. Los valores obtenidos por cualquier método automático varían desde 22 a 32 mmol/L, de acuerdo con la información de los fabricantes del producto.

Niños, 18-27 mmol/L

Adultos 21-31 mmol/L

Ácido láctico

Steven C. Kazmierczak

Principios del análisis y uso corriente.

Los métodos iniciales para la medición del ácido láctico estaban basados en la oxidación del lactato por permanganato o dióxido de manganeso para formar un acetaldehído y CO_2 ó CO. La cantidad de lactato en la muestra es proporcional a la cantidad de productos formados, que pueden ser determinados por una gran variedad de técnicas. Acetaldehído puede ser medido colorimétricamente, [refs\(514\)](#) o titulación, [ref\(515\)](#) o por cromatografía de gases, [ref\(516\)](#) El CO formado puede ser cuantificado por titulación o por análisis gasométrico. El CO formado (Tabla 25-7, método 1b) puede ser determinados para titulación, [ref\(517\)](#) o análisis gasométrica, [ref\(518\)](#) El CO_2 formado (Tabla 25-7, método 1c) que pueden ser cuantificado gasométricamente mediante un manómetro de Van Slyke, [ref\(519\)](#)

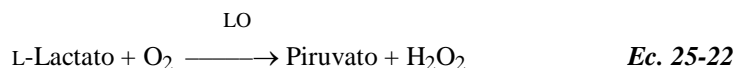
Los métodos enzimáticos para lactato emplean lactato hidrogenasa o lactato oxidasa. Métodos basados en lactato deshidrogenasa (LD) controlan la oxidación del lactato a piruvato con formación concomitante de NADH (Tabla 25-7, método 2).

LD



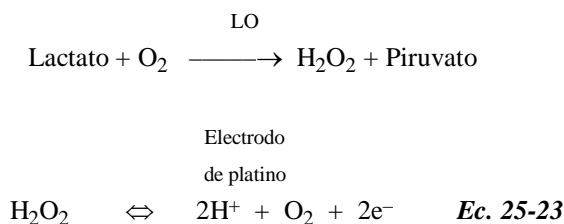
Debido a que el equilibrio para esta reacción está muy desplazado a la izquierda, se requiere alguna modificación para revertir este equilibrio a favor de la formación de piruvato. El uso de una reacción alcalina (pH 9.0), presencia de exceso de NAD^+ , y el uso de agentes atrapadores tales como hidrazina, para retirar el piruvato en la medida en que se forma ayuda a desplazar el equilibrio de esta reacción a la derecha. La formación de NADH puede ser controlada por medios espectrofotométricos (340 nm) o métodos fluorométricos.

Lactosa oxidasa (LO) también ha sido utilizada en varios métodos enzimáticos para lactato incluyendo métodos colorimétricos y el desarrollo de una tira reactiva. Lactato oxidasa cataliza la siguiente reacción:



El peróxido de hidrógeno generado en esta reacción puede oxidar varios compuestos indicadores para producir un cambio de color que es detectado espectrofotométricamente o generalmente usando una técnica de tira reactiva visual.

Lactato oxidasa también ha sido utilizada en la producción de electrodos lactato-específicos (Tabla 25-7, método 3). Lactato-oxidasa es inmovilizada en la membrana de un electrodo. El peróxido de hidrógeno producido durante la oxidación de lactato a piruvato es detectado por oxidación del ánodo de platino:



Este método tiene la ventaja de poder usar muestras de sangre entera.

Un método para cuantificar lactato mediante el uso de detección electroquímica también ha sido desarrollado. El principio de esta técnica depende de la oxidación de lactato por ferricianuro, que es catalizado por lactato deshidrogenasa (Tabla 25-7, método 4). El hexacianoferrato II que es producido por esta reacción es luego oxidado en un electrodo de platino. La cantidad de corriente generada en el electrodo de platino es proporcional a la cantidad de hexacianoferrato formado y, por tanto, la cantidad de ácido láctico inicialmente presente en la muestra.

Especimen.



Mediciones precisas de ácido láctico requieren de una atención especial para el procesamiento de la muestra. La estasis venosa aumentará el lactato de la sangre; el tiempo de restricción por torniquete debe ser minimizado, o si un torniquete es utilizado, 1 a 2 minutos deberán transcurrir después de la liberación del torniquete antes que la sangre sea extraída. En especímenes que contienen células metabólicamente activas, la glucosa es convertida a lactato por vías glicolíticas celulares. La sangre puede ser mantenida a 4° C hasta 2 horas sin cambios significativos en las concentraciones de lactato. Sin embargo, la muestra recomendada para análisis de ácido láctico es un suero tomado de un tubo flebotomía de yodoacetato de sodio. Concentraciones de ácido láctico en muestras recogidas con yodoacetato de sodio son buenas hasta dos horas a temperatura ambiente.[ref\(520\)](#) El fluoruro también puede ser utilizado como inhibidor de la vía glicolítica.[ref\(521\)](#) El oxaloacetato no puede ser utilizado como un anticoagulante, ya que inhibirá la lactato deshidrogenasa utilizado en algunos ensayos enzimáticos de lactato. Ciertas drogas incluyendo la epinefrina, isoniazida, contraceptivos orales, morfina, aspirina, ácido valproico, fenitoina y fenobarbital pueden modificar las concentraciones del lactato por alterar su metabolismo.[ref\(522\)](#)

Intervalos de referencia.

Tipo de Especimen	Lactato, mmol/L
Sangre venosa	0.5-2.2
Sangre arterial	0.5-1.6
Fluido cerebroespinal	
Edad <16	1.1-2.2
Adulto	<2.8

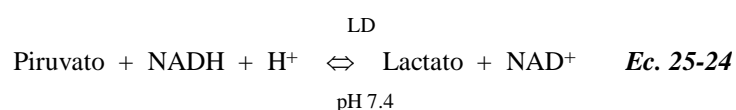
Estas concentraciones de lactato en la sangre son para pacientes en reposo; en otra situación valores más altos podrán ser observados. Las concentraciones de lactato podrán aumentar 20 a 50% sobre los valores línea base después de una comida.[ref\(523\)](#) Concentraciones de ácido láctico en líquido cefalorraquídeo espinal son independientes de niveles de suero pero usualmente son cercanos a aquellos vistos en la sangre.[ref\(524\)](#)

Acido pirúvico

Steven C. Kazmierczak

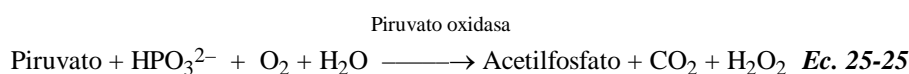
Principios de análisis y uso corriente.

La medición de piruvato en la sangre tiene mucha importancia en medicina de cuidados intensivos y fisiología del ejercicio.[ref\(525\)](#) El método más común en uso para el análisis del ácido pirúvico utiliza la enzima lactato deshidrogenasa (LD) para catalizar la siguiente reacción (Tabla 25-8, método 1)[ref\(526\)](#):



El consumo de NADH es controlado a 340 nm y está relacionado con concentraciones de piruvato en la muestra. La reacción puede ser seguida cinéticamente, al medir la tasa de desaparición del NADH, o puede ser realizada en modo punto-final. La reacción es realizada a pH 7.4 con un exceso de NADH, que favorece la conversión del piruvato a lactato. Esta es la misma reacción que es utilizado para medir lactato excepto que el análisis para ácido láctico es realizado a pH 9.8, y un exceso de NAD⁺ se encuentra presente, que favorece fuertemente la oxidación del lactato a piruvato.

Un biosensor también ha sido desarrollado para la medición del piruvato en sangre entera o suero (Tabla 25-8, método 2)^{ref(527)} con una membrana que contiene piruvato oxidasa inmovilizado y protegido con una membrana de acetato celulosa. La reacción de piruvato en la presencia de piruvato oxidasa es como sigue:



El H₂O₂ producido es medido amperométricamente y relacionado con la concentración de piruvato presente en la muestra. Varios cofactores, incluyendo pirofosfato de tiamina (TPP), fosfato, y cloruro de calcio son requeridos para la reacción catalizada por piruvato oxidasa.^{ref(528)}

Especimen.

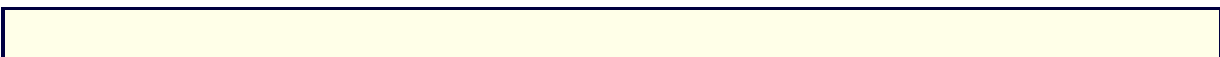
La sangre debe ser tomada de los pacientes en ayunas. Para evitar que el metabolismo de glucosa por células rojas de la sangre, la sangre debe ser tomada en un tubo que contiene yodoacetato (con un tapón gris). Un ligero ejercicio aumentará la concentración del piruvato en la sangre. El ácido pirúvico es un inestable a temperatura ambiente. El suero deberá ser separado inmediatamente y mantenido a 4° a 8° C hasta el análisis. Se recomienda la preparación de un sobrenadante de suero o plasma libre de proteína para la preservación de la muestra. Retrasos de 1 hora o más antes de deproteinización han sido encontrados inaceptables.^{ref(529)} El uso de ácido metafosfórico (MPA) para la preparación del sobrenadante libre de proteína es recomendado sobre otros agentes debido a que al NADH es mucho más estable cuando se usa MPA.²⁹ El sobrenadante libre de proteínas es estable durante 6 días a temperatura ambiente, 8 días si se mantiene refrigerado, y hasta 42 días si se congela.

Intervalo de referencia.

La concentración de piruvato en adultos sanos es <0.10 mmo/L

Referencias

1. Clark LC: Monitor and control of blood and tissue oxygen tensions, *Trans Am Soc Artif Intern Organs* 2:41-48, 1956.
2. Rem J, Siggard-Andersen O, Norgard-Pedersen B, Sorensen S: Hemoglobinpigments: photometer for oxygen saturation, carboxyhemoglobin, andmethemoglobin in capillary blood, *Clin Chim Acta* 42:101, 1972.
3. Burnett RW, Covington AK, Fogh-Andersen N, et al: Recommendations on wholeblood sampling, transport,



- and storage for simultaneous determination of pH, blood gases, and electrolytes. *J Int Fed Clin Chem* 6:115-120, 1994.
4. Siggard-Andersen O: In *The acid-base status of the blood*, ed 4, Copenhagen, 1974, Munksgaard, p 152.
 5. Rosenberg E, Price N: Diffusion of CO₂ and O₂ through the walls of plastic syringes, *Clin Chem* 37:1244-1248, 1991.
 6. Mahoney JJ, Harvey JA, Wong RJ, Van Kessel AL: Changes in oxygen measurements when whole blood is stored in iced plastic or glass syringes, *Clin Chem* 37:1244-1248, 1991.
 7. Hilty H, Karendal B: Effect of syringe material on oxygen tension in stored blood, *Acta Soc Upsal* 193-205, 1969.
 8. Natelson S: Routine use of ultramicro methods in the clinical laboratory, *Am J Clin Pathol* 21:1153-1172, 1951.
 9. Meites S, Faulkner WR: *Manual of practical micro and general procedures in clinical chemistry*, Springfield, Ill., 1961, Charles C Thomas.
 10. Skeggs LT Jr: An automatic method for the determination of carbon dioxide in blood plasma, *Am J Clin Pathol* 33:181-185, 1960.
 11. Ungerer JP, Ungerer MJ, Vermaak JH: Discordance between measured and calculated total carbon dioxide, *Clin Chem* 36:2093-2096, 1990.
 12. Hochella NJ, Weinhouse S: Automated lactic acid determination in serum and tissue extracts, *Anal Biochem* 10:304, 1965.
 13. Barker SB: Lactic acid. In Seligson D, editor: *Standard methods of clinical chemistry*, New York, 1961, Academic Press, vol 3.
 14. Long C: The stabilization and estimation of lactic acid in blood samples, *Biochem J* 40:27, 1946.
 15. Savory J, Kaplan A: A gas chromatographic method for the determination of lactic acid in blood, *Clin Chem* 12:559-569, 1966.
 16. Ronzoni E, Wallen-Lawrence Z: Determination of lactic acid in blood, *J Biol Chem* 74:363-377, 1927.
 17. Schneyer J: Eine methode zur quantitativen Milchsäurebestimmung im Harne, *Biochem Z* 70:294, 1915.
 18. Avery BF, Hastings AB: A gasometric method for the determination of lactic acid in the blood, *J Biol Chem* 94:273-280, 1931.
 19. Kaplan LA, Gau N, Stein EA: Collection and storage of serum lactic acid samples at room temperature without deproteinization, *Clin Chem* 26:175-176, 1980.
 20. Astles R, Williams CP, Sedor F: Stability of plasma lactate in vitro in the presence of antiglycolytic agents, *Clin Chem* 40:1327-1330, 1994.
 21. Kiechle FL: *Lactate: review of methods*, ASCP check sample volume 8, no 7, PTS 92-7 (PTS-65), American Society of Clinical Pathologists.
 22. Friedmann TE, Haugen GE, Kmiecik TC: Pyruvic acid III, *J Biol Chem* 157:673-689, 1945.
 23. Glasser L: Body fluids III: tapping the wealth of information in CSF, *Diagn Med*, pp 23-33, Jan-Feb 1981.
 24. Bonora R, Pagani F, Panteghini M: Pyruvate measured in whole blood with the Cobas Bio analyzer, *Clin Chem* 35:325, 1989.
 25. Hansen JL, Freier EF: Direct assays of lactate, pyruvate, β -hydroxybutyrate and acetoacetate with a centrifugal analyzer, *Clin Chem* 24:475-479, 1978.
 26. Chariot P, Ratiney R, Ammi-Said M, et al: Optimal handling of blood samples for routine measurement of lactate and pyruvate, *Arch Pathol Lab Med* 118:695-697, 1994.
 27. Mascini M, Mazzei F, Moscone D, et al: Lactate and pyruvate electrochemical biosensors for whole blood in extracorporeal experiments with an endocrine artificial pancreas, *Clin Chem* 33:591-593, 1987.
 28. Marbach EP, Weil MH: Rapid enzymatic measurement of blood lactate and pyruvate. *Clin Chem* 1967; 13: 314-325.



Bibliografía

- Arieff AI, DeFronzo RA: *Fluid, electrolyte and acid-base disorders*, ed2, New York, 1995, Churchill Livingstone.
- Cohen JJ, Kassirer JP: *Acid-base*, Boston, 1982, Little, Brown & Co.
- Davenport HW: *The ABC of acid-base chemistry*, ed 6, Chicago, 1974, University of Chicago Press.
- Haber RJ: A practical approach to acid-base disorders, *West J Med* 155 (2):146-151, 1991.
- Soloway HB: How the body maintains acid-base balance, *Diagn Med*, pp 32-41, Feb 1979.
- Scanlon CL, Spearman CD: Sheldon R: *Egan's fundamentals of respiratory care*, ed 6, St. Louis, 1995, Mosby.

Tablas

Tabla 25-1. Amortiguadores fisiológicamente importantes y su concentración, pKa, y capacidad amortiguadora.

Amortiguador	pK _a	Concentración mmol/L	Capacidad relativo amortiguación (mEq/L)
Bicarbonato	6.33	25	1
Hemoglobina	7.2	53	40
Fosfato	6.8	1.2	0.3
Proteína	—	—	8

Tabla 25-2. Comparación del aire (presión parcial expresada en mm Hg.)

Aire	N ₂	O ₂	CO ₂	H ₂ O	Presión Total
Atmosférico	598.0	158.0	0.3	3.7	760
Alveolar	573.0	100.0	40.0	47.0	760
Espirado	566.0	115.0	32.0	47.0	760

Tabla 25-3. Valores referencia para parámetros gases en sangre en adultos en sangre arterial y venosa.

Parámetros	Arterial	Venosa
PH	7.35-7.45	7.33-7.43
PCO ₂	35-45 mm Hg	38-50 mm Hg



Po ₂	80-100 mm Hg	30-50 mm Hg
HCO ₃ ⁻	22-26 mmol/L	23-27 mmol/L
CO ₂ total	23-27 mmol/L	24-28 mmol/L
Saturación de O ₂	94 – 100 %	60 – 85%
Hiato aniónico venoso	5-14 mmol/L	5-14 mmol/L
Exceso de Base	-2 a +2 mEq/L	-2 a +2 mEq/L

Tabla 25-4. Clases de alteraciones del equilibrio acido-base con sus efectos correspondientes en parámetros seleccionados de gases en sangre.

Desorden	pH	PCO ₂	HCO ₃ ⁻	Exceso de base
Acidosis metabólica	↓	↓N	↓	↓
Acidosis respiratoria	↓	↑	↑N	↑N
Alcalosis metabólica	↑	↑N	↑	↑
Alcalosis respiratoria	↑	↓	↓N	↓N
N, Inicialmente normal (dentro del intervalo de referencia)				

Tabla 25-5. Alteraciones comunes del equilibrio ácido base y efectos en parámetros seleccionados de gases en sangre.

Saturación Desorden O ₂	pH	PCO ₂	PO ₂	HCO ₃ ⁻	Exceso de base	Hiato aniónico
Síndrome de ↓ distress respiratorio	↓	↑	↓	N	N	N
Acidosis ↓ láctica	↓	N*	N	↓	↓	↑
Cetosis ↓ diabética	↓	N*	N	↓	↓	↑
Enfisema	↓	↑	↓	N*	N	N

↓						
Envenamamiento	↓	N*	N	↓	↓	↑
↓						
por metanol						
Fallo renal	↓	N*	N	↓	↓	↑
↓						
N*, inicialmente normal; N siempre normal (dentro del intervalo de referencia)						

Tabla 25-6. Métodos de análisis de CO₂ total .

Método:	Liberación de gas
Análisis:	Manométrico o termométrico
Principio:	CO ₂ es liberado de las muestras después de adicionar el ácido, y la presión de gas es medida manométricamente o por conductividad térmica.
Uso:	Raro
Comentarios:	El método de referencia utilizado con propósitos de calibración
Método:	Indicador pH
Análisis:	Espectrofotométrico
Principio:	CO ₂ + Ácido → CO ₂ gas
	<p style="text-align: center;">Silicona membrana</p> <p>CO₂ gas → CO₂ disuelto, ↓ pH</p> <p>H⁺ + pH indicador → Cambio de color</p>
Uso:	Raro
Comentarios:	Utilizado en analizadores de flujo continuo.
Método:	Electrodo CO ₂
Análisis:	Electrodo selectivo de iones (pH)
Principio:	Después de acidificación de la muestra, CO ₂ difunde a través de una membrana de silicona a un amortiguador diluido en bicarbonado. El cambio de pH resultante medido por un electrodo de pH está relacionado con el contenido de CO ₂ total
Uso:	Común
Comentarios:	El mismo electrodo con que se mide PCO ₂ en analizadores de gases en sangre
Método:	Enzimático
Análisis:	Espectrofotométrico
Principio:	<p style="text-align: center;">PEPC</p> <p>HCO₃⁻ + PEP → OX + P_i</p> <p style="text-align: center;">MDH</p> <p>OX + NADH + H⁺ → MAL + NAD⁺ (↓ A, 340 nm)</p>



Uso:	Común
Comentarios:	utilizado en analizadores discretos
Método:	Cálculo
Análisis:	Electrodo selectivo de iones (pH y PCO_2)
Principio:	CO_2 total calculado de datos obtenidos del análisis del gases en sangre $\text{CO}_2 \text{ total} = \alpha \text{PCO}_2 + [\text{HCO}_3^-]$
Uso:	Común
Comentarios:	Aunque sólo da una estimación se correlaciona bien con los valores medidos
<i>MAL</i> , Malato; <i>MDH</i> , deshidrogenasa malato; <i>NADH</i> , dihidronicotinamida adenina dinucleotido; <i>OX</i> , oxaloacetato; <i>P_i</i> ; fosfato inorgánico; <i>PEP</i> , fosfoenolpiruvato, <i>PEPC</i> , fosfoenolpiruvato, carboxylasa.	

Tabla 25-7. Método de análisis de lactato.

Método:	1. Oxidación química con formación de:
Principio:	Permanganato (MnO_4) o MnO_2 oxida el lactato a uno de los varios productos en una de las siguientes reacciones:
Uso:	Histórico
Comentarios:	Exacto y sensible pero consume mucho tiempo.
Método:	a. Acetaldehído (CH_3CHO)
Tipo de análisis:	Cuantitativo, EP
Principio:	H_2SO_4 $\text{Lactato} \xrightarrow{\text{Calor}} \text{Acetaldehído} + \text{H}_2\text{O} + \text{CO}$
Método:	b. CO (monóxido de carbono)
Tipo de análisis:	Cuantitativo, EP
Principio:	Como arriba
Método:	c. CO (anhídrido carbónico)
Tipo de análisis:	Cuantitativo
Principio:	$2 \text{ Lactato} + \text{O}_2 \rightarrow 2 \text{ acetaldehído} + 2\text{CO} + \text{H}_2\text{O}$
Método:	2. Enzimático
Tipo de análisis:	Cuantitativo, EP o K
Principio:	LD $\text{Lactato} + \text{NAD} \rightarrow \text{Piruvato} + \text{NADH} + \text{H}^+$
Uso:	Automático y preciso
Comentarios:	Se puede automatizar y es rápido.
Método:	3. Electrodo sensor de enzimas
Tipo de análisis:	Cuantitativo, EP



Principio:	LO $\text{Lactato} + \text{O}_2 \longrightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Piruvato}$ $\text{H}_2\text{O}_2 \rightleftharpoons 2\text{H}^+ + \text{O}_2 + 2\text{e}^-$ <p>La corriente medida es proporcional a la concentración de peróxido de hidrógeno (H_2O_2)</p>
Uso:	Semi-automática
Comentarios:	Se encuentra incorporada en analizadores de gases en sangre.
Método:	4. Electroquímico
Tipo de análisis:	Cuantitativo, EP
Principio:	$\text{Lactato} + 2\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-} \rightarrow \text{Piruvato} + 2\text{H}^+ + 2\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ $2\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-} \xrightarrow{\text{Pt electrodo}} 2\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-} + 2\text{e}^-$
Uso:	Automático
Comentarios:	Análisis preciso, sensible y rápido, pero el equipo no es fácilmente disponible.
<i>EP</i> , Punto Final; <i>K</i> cinético; <i>LD</i> Lactato deshidrogenasa; <i>LO</i> , lactato oxidasa.	

Tabla 25-8. Métodos para análisis de ácido pirúvico.

Método:	1. Enzimático
Principio:	Piruvato convertido a lactato con oxidación contaminante de NADH a NAD por lactato deshidrogenasa. NADH controlado espectrofotométricamente a 340 nm.
	LD
Uso:	$\text{Piruvato} + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{Lactato} + \text{NAD}$ <p>Plasma, suero</p>
Comentarios:	Específico, método más comúnmente utilizado, fácilmente utilizado
Método:	2. Amperométrico
Principio:	El piruvato reacciona con piruvato oxidasa que ha sido inmovilizado sobre una membrana artificial. El H_2O_2 producido es medido amperométricamente
	PO
Uso:	$\text{Piruvato} + \text{HPO}_4^{2-} + \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{Acetilfosfato} + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$ <p>Plasma, suero, sangre entera</p>
Comentarios:	Experimental; correlaciona bien con el método enzimático de piruvato .

Figuras

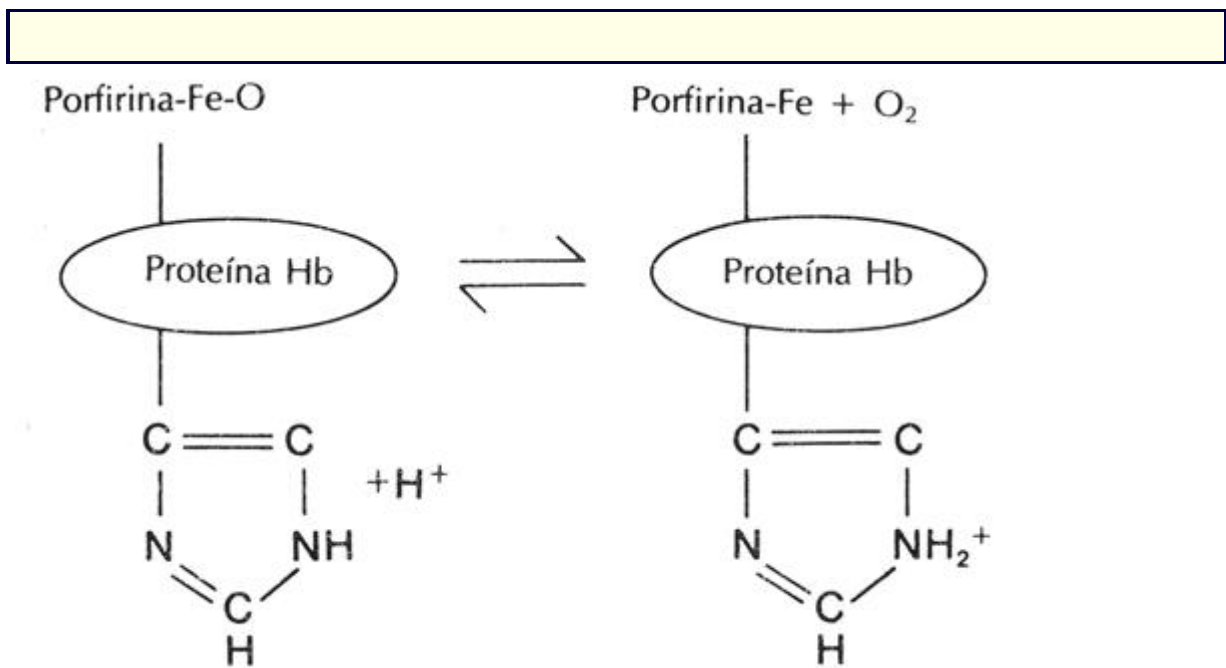


Figura 25-1 Efecto de la oxigenación de la hemoglobina sobre la acción amortiguadora del grupo imidazol de la histidina. La unión afecta al pK_a del anillo imidazol, haciendo que el anillo sea más ácido con liberación de un H^+ .

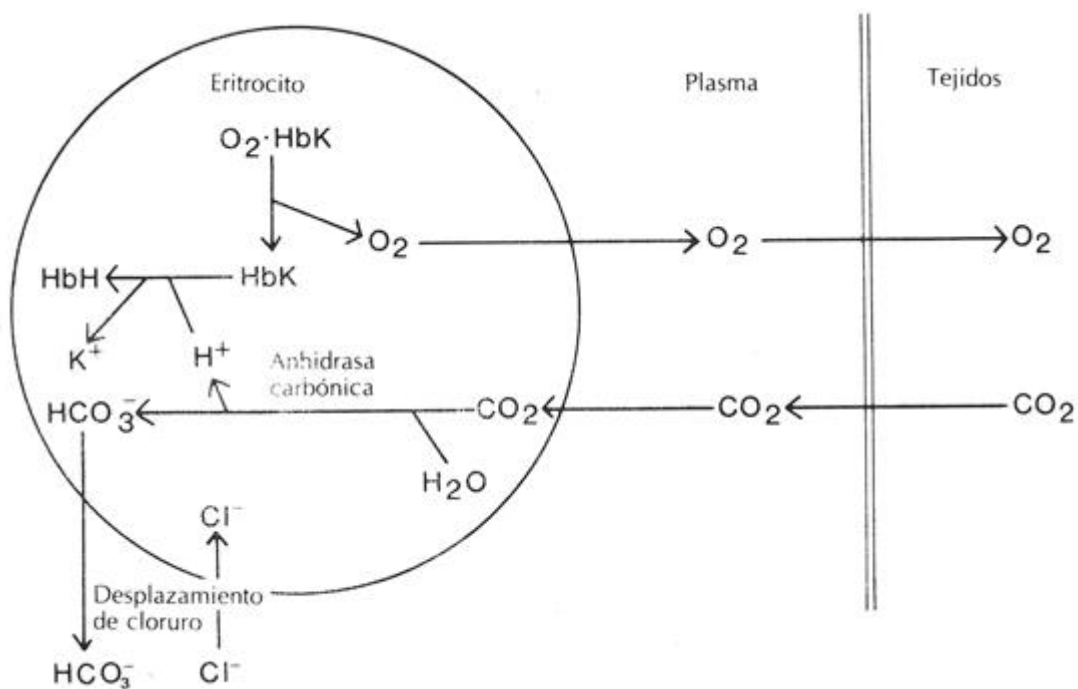


Figura 25-2 Acción amortiguadora de la hemoglobina en tejidos periféricos. La HbK es una sal de potasio de la hemoglobina. HbH es la forma protonada de la hemoglobina.

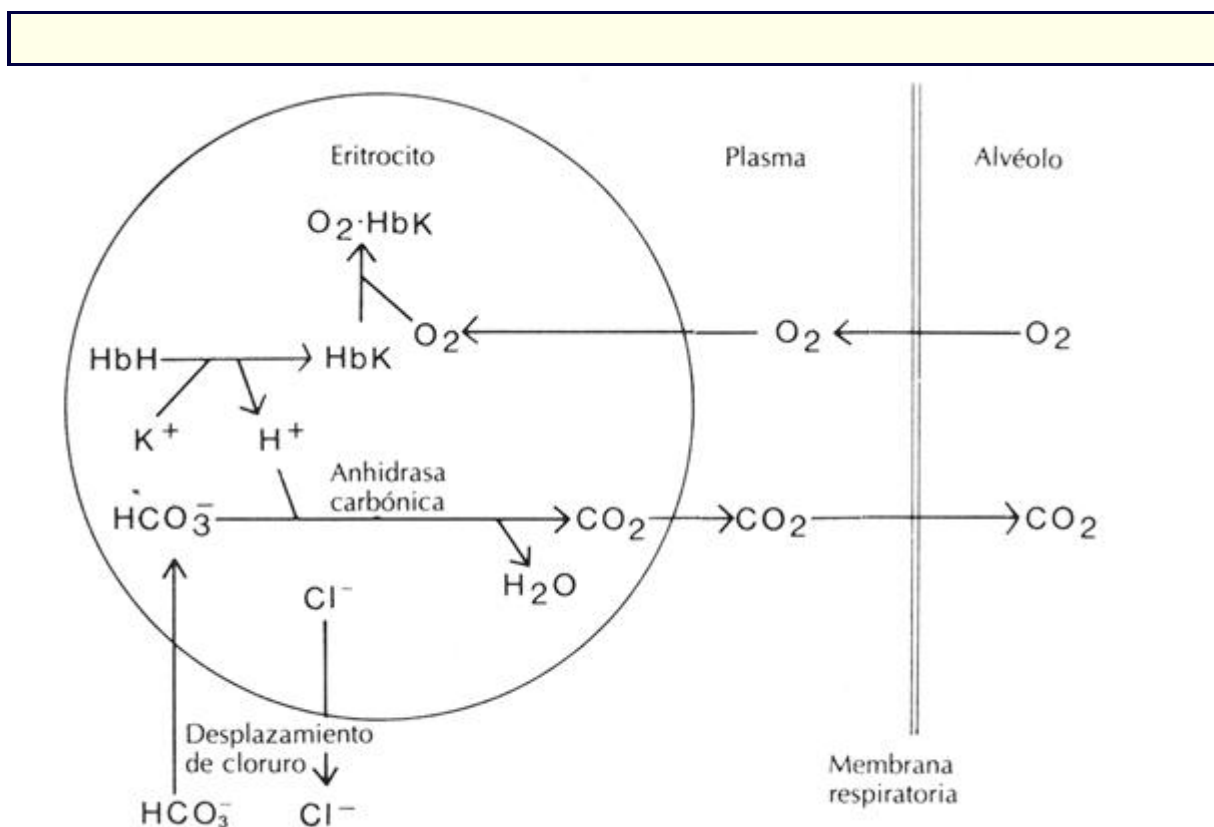


Figura 25-3 Transferencia de CO₂ en los pulmones desde los eritrocitos a los sacos de aire. HbK, sal de potasio de hemoglobina; HbH es la forma protonada de la hemoglobina

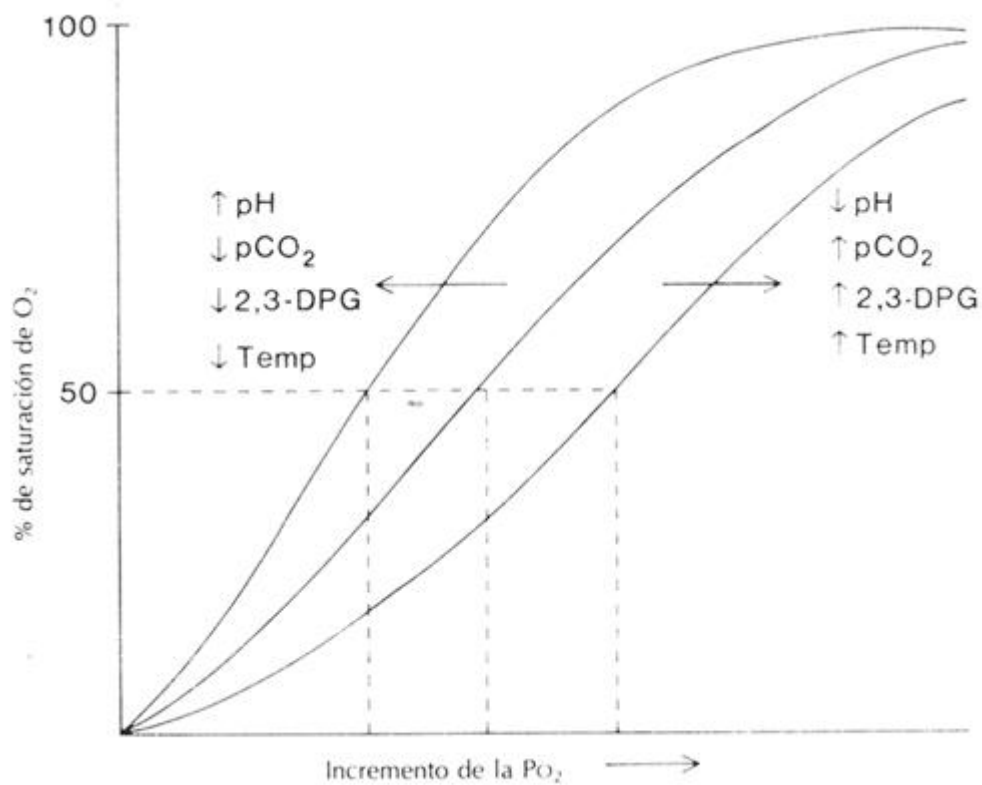


Figura 25-4 Curvas de disociación de hemoglobina-oxígeno y factores que desplazan la curva a la derecha o izquierda. Un cambio de la curva a la derecha o izquierda cambia el nivel de PO_2 donde la hemoglobina se encuentra sautrada al 50% (P_{50}).

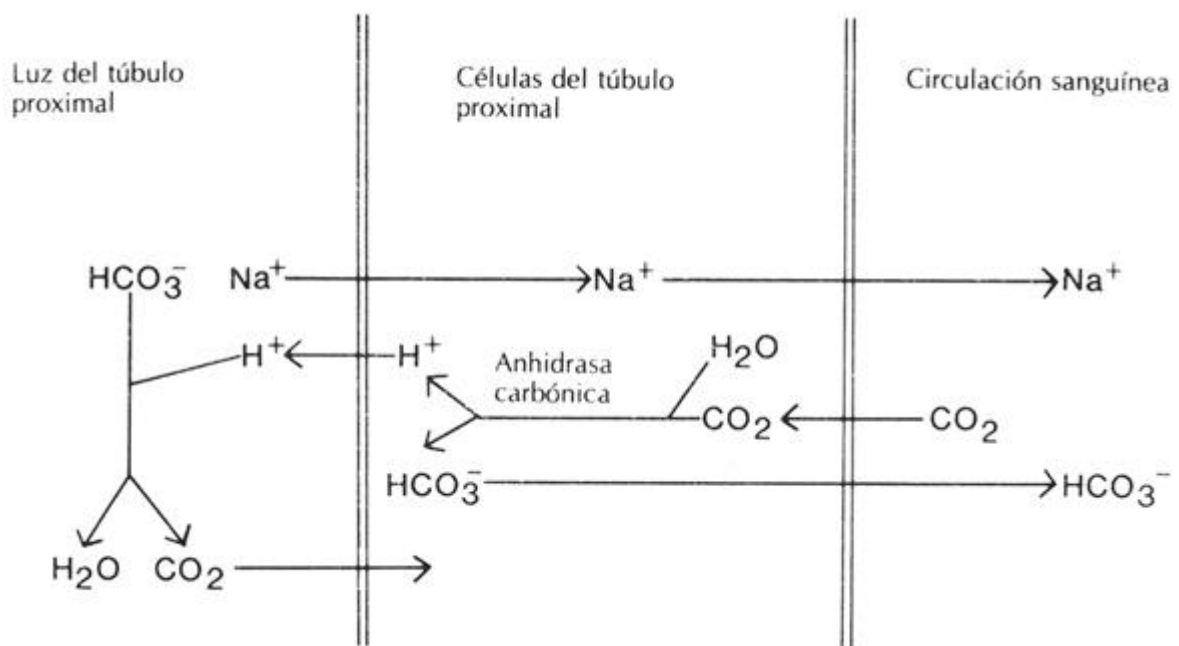


Figura 25-5 Reabsorción de bicarbonato por el riñón con excreción de H^+ .

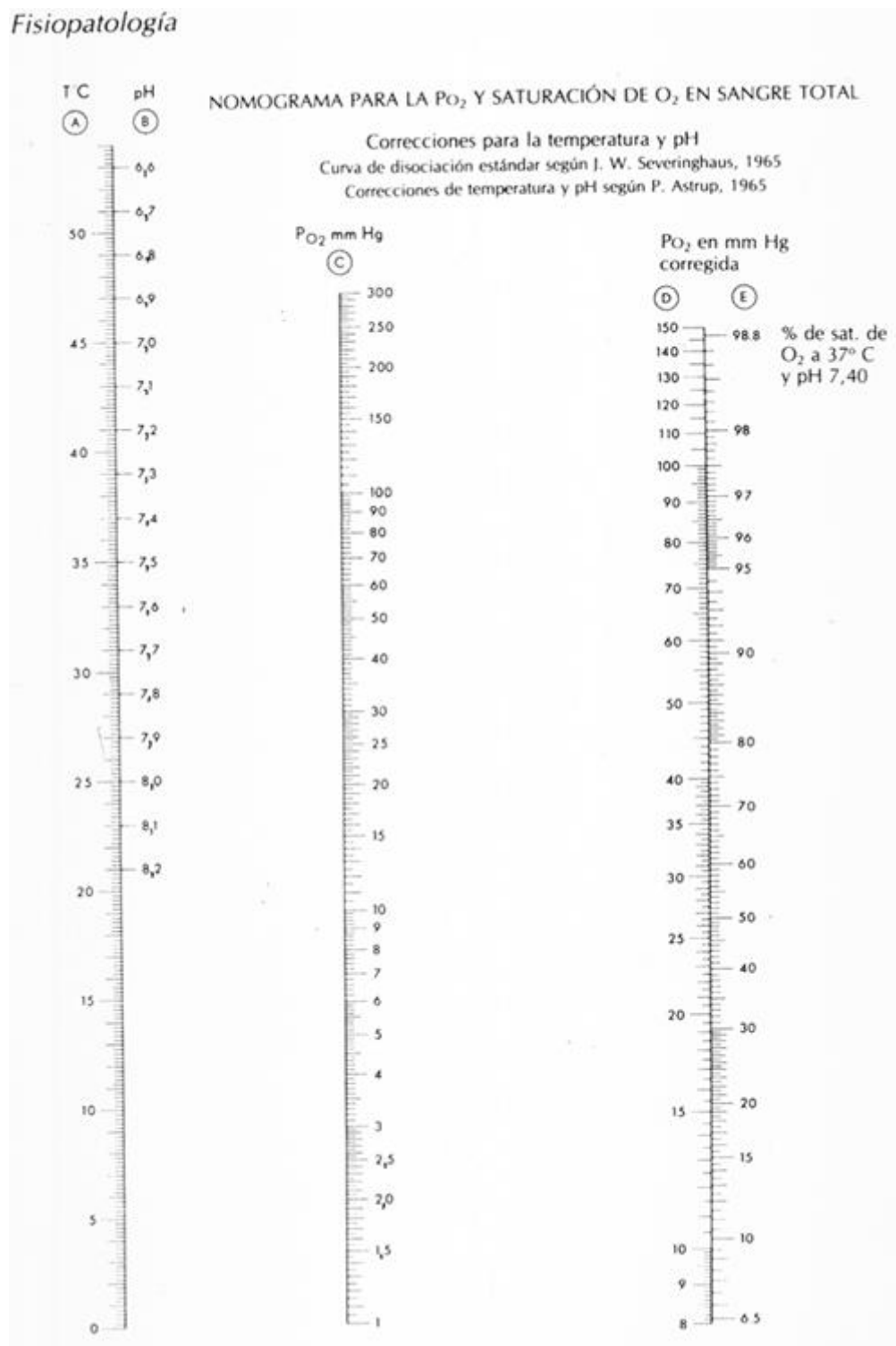


Figura 25-6 Nomograma de relación entre saturación de pH, PO_2 y O_2 . Una línea recta a través del valor de pH y PO_2 que conectará con un valor calculado de saturación

de O₂ a 37° C. (Cortesía de Radiometer Corp. Copenhagen, Dinamarca.)

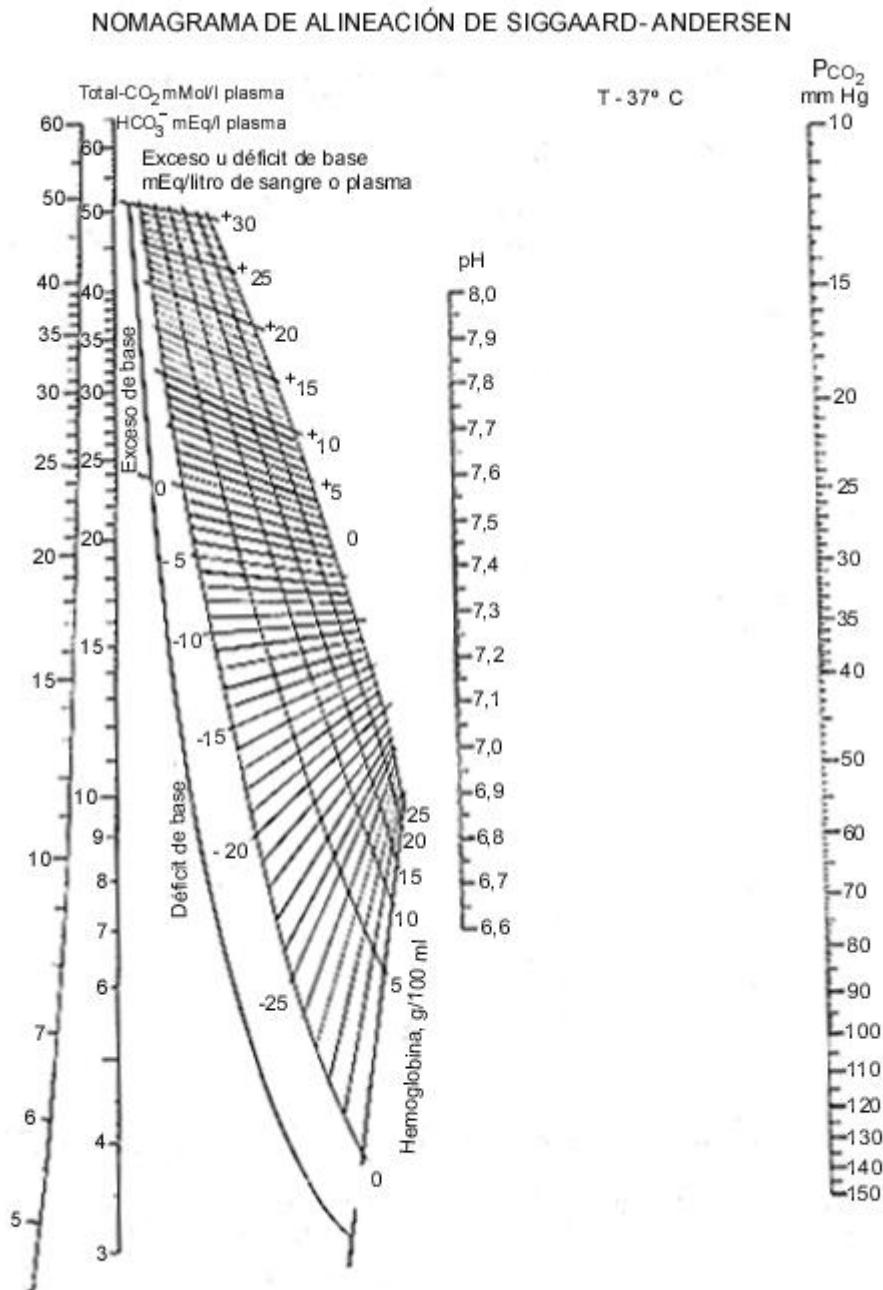


Figura 25-7 Nomograma de relación entre PCO₂, pH, exceso de base, hemoglobina, bicarbonato y CO₂ total. Una línea recta a través del valor de pH y PCO₂ que conectará con un valor calculado de saturación de HCO₃⁻ y CO₂ total. El exceso de base o déficit puede ser estimado desde una línea recta si se conoce el nivel de hemoglobina. (Modificado de Radiometer Corp. Copenhagen, Dinamarca)

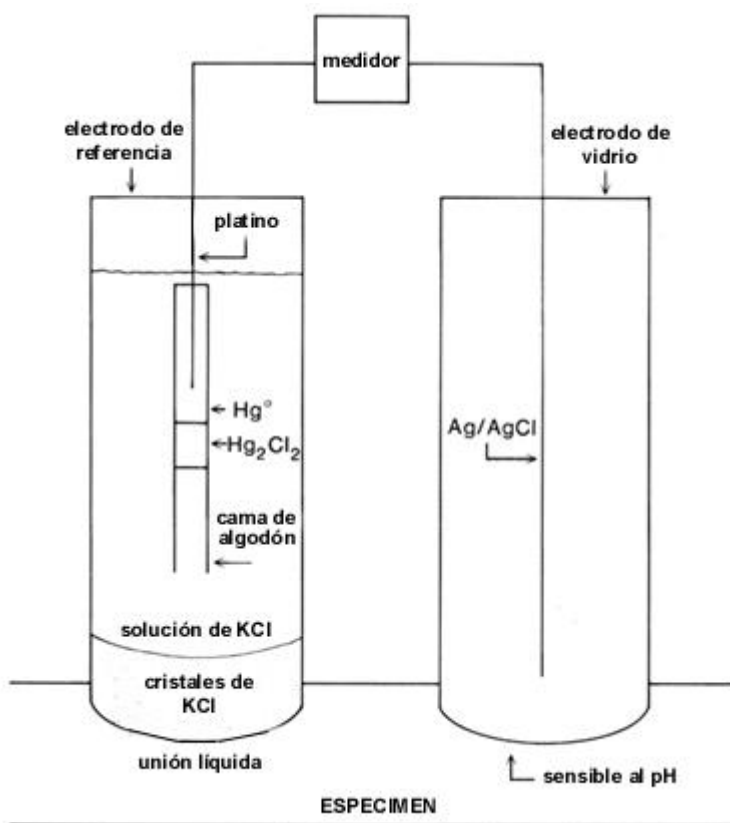


Figura 25-8 Esquema de un electrodo pH y electrodo de referencia de calomel. Se desarrolla un potencial a través de una membrana de vidrio sensible a pH del electrodo de pH debido a la diferencia de pH entre la muestra exterior y solución amortiguadora del electrodo interior. El electrodo de calomel está en contacto eléctrico con la muestra y el electrodo de pH a través de un puente salino de KCl y actúa como una referencia frente al potencial desarrollado en el electrodo de pH.

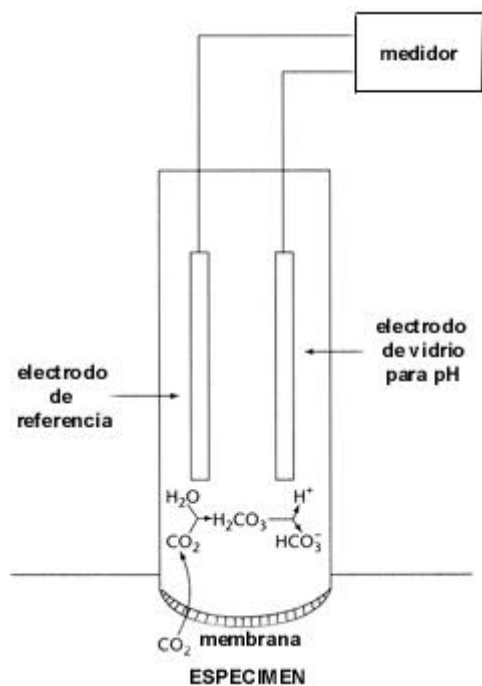


Figura 25-9 Esquema del electrodo PCO_2 . El CO_2 difunde a través de la membrana exterior, que no es permeable al HCO_3^- ó H^+ , a una capa de solución de bicarbonato. La reacción de CO_2 y H_2O difundido para formar ácido carbónico cambia el pH en la solución de bicarbonato, que es detectado por el electrodo interno pH.

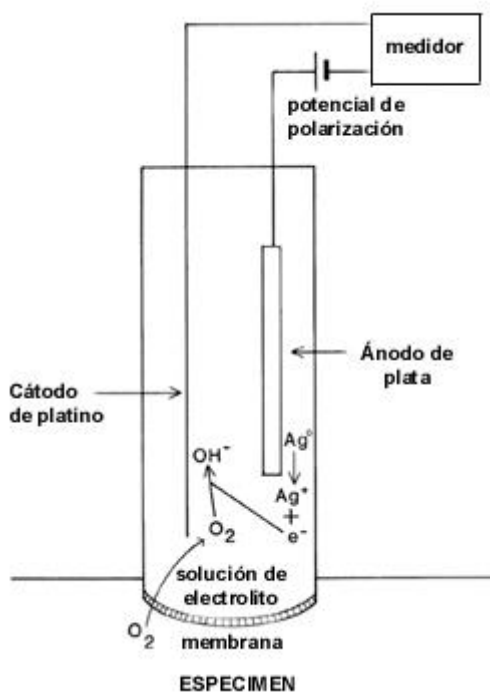


Figura 25-10 Esquema de un electrodo polarográfico Clark. Un voltaje constante es



generado entre el cátodo de platino y el ánodo de plata. Las moléculas de oxígeno que difunden más allá de la membrana exterior en una capa de solución electrolítica en contacto con el cátodo de platino son reducidas en el cátodo, lo que produce una corriente que puede ser medida y relacionada con la cantidad de oxígeno difundido.

CAPÍTULO 26

26. Función Renal

M. Roy First.

Anatomía del riñón

Anatomía macroscópica

Anatomía microscópica

Fisiología renal

Formación de orina

Regulación de fluidos y balance electrolítico

Balance ácido básico

Excreción de residuos nitrogenados

Función hormonal

Conservación de proteínas

Condiciones patológicas del riñón

Glomerulonefritis aguda

Síndrome nefrótico

Enfermedades tubulares

Infecciones del tracto urinario

Enfermedades vasculares

Diabetes melitus

Obstrucciones del tracto urinario

Cálculos renales

Falla renal crónica

Falla renal aguda

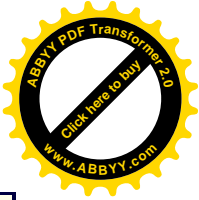
Pruebas funcionales renales

Test de la función glomerular

Test de la función tubular

Urianálisis

Modificaciones de los analitos en enfermedad



Electrolitos séricos
Electrolitos urinarios
Anion gap
Creatinina, urea, y ácido úrico
Calcio y fósforo
Proteinuria
Enzimas en orina
Hemoglobina y hematocrito

Métodos de análisis

Creatinina
Urea
Ácido úrico
Proteínas urinarias totales

OBJETIVOS

- ♦ Listado de las cinco principales funciones mayores del riñón y reseña de la formación de orina, incluyendo la función de las siguientes estructuras.
 - Glomérulo.
 - Túbulo proximal.
 - Asa de Henle.
 - Túbulo contorneado distal.
 - Túbulo colector.
- ♦ Reseña del mecanismo por el cual el riñón conserva las proteínas y describir la producción metabólica y control renal del nitrógeno ureico de la sangre, Creatinina sérica, y ácido úrico.
- ♦ Especificar condiciones patológicas asociadas al riñón, enunciar los resultados anormales de laboratorio esperados.
- ♦ Expresar los propósitos de realizar test de “depuración” renales, y las razones por las cuales la creatinina es la más frecuentemente usada para testear el “clearance” renal. Exponer las ventajas y desventajas del uso del “depuración” de inulina y urea.
- ♦ Exponer los dos tipos de estudios usados para evaluar la función tubular renal.

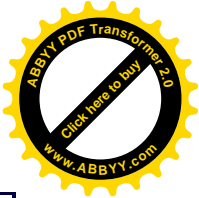
Términos Clave

absorción (activa o pasiva) Proceso de captación de sustancias dentro de los tejidos o células. La absorción activa requiere el consumo de energía para lograr el movimiento de sustancias contra un gradiente de concentración, mientras en el caso de absorción pasiva las sustancias se mueven desde una concentración mayor hacia una menor.

ácido titulable Combinación de hidrogeniones con el fosfato presente en la orina final.

albuminuria Presencia de albúmina en orina.

aldosterona Hormona esteroide producida en la corteza adrenal que actúa



sobre los túbulos distales estimulando la reabsorción de sodio y potasio y la excreción de hidrógeno.

anhidrasa carbónica Enzima que, a nivel del ribete en cepillo de las células del túbulo proximal, cataliza la reacción: $\text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{CO}_3$.

anuria Condición en la que no se forma orina.

asa de Henle Túbulo en forma de U que conecta los túbulos proximal y distal. Su función es la reducción del volumen del líquido tubular.

cápsula de Bowman Estructura compuesta por la porción inicial del túbulo proximal que rodea al glomérulo.

carga filtrada Cantidad de una sustancia que es presentada a los túbulos para ser filtrada.

cilindros Agregados proteicos que adquieren la forma moldeada de los túbulos renales y son excretados en la orina.

corteza renal Parte externa del riñón que contiene mayormente glómerulos y túbulos contorneados.

densidad Es la relación entre el peso en gramos por mililitro de un fluido corporal comparado con el agua.

depuración (clearance) Concepto teórico que expresa el volumen de plasma filtrado a nivel glomerular por unidad de tiempo en el cual una sustancia sería completamente eliminada y excretada en la orina final. Usualmente se expresa en mililitros de plasma por minuto.

depuración de creatinina Cálculo estimativo del índice de filtración.

diurético Droga cuya acción promueve una mayor excreción de sal y agua, con aumento del flujo urinario.

glomerular (IFG) Obtenido mediante la determinación de la cantidad de creatinina plasmática y de su índice de excreción urinaria.

glomérulos Ovillos de pequeños vasos renales que se proyectan en el interior del extremo expandido(cápsula) de los túbulos proximales; funcionan como el mecanismo filtrante del riñón.

hematuria Presencia de sangre o glóbulos rojos en orina.

hormona antidiurética (HAD) También llamada vasopresina: hormona hipofisiaria que actúa al nivel de los túbulos colectores para incrementar la absorción de agua con la formación de una orina más concentrada.

índice de filtración Glomerular (IFG) Velocidad en mililitros por minuto a la que las sustancias plasmáticas son filtradas a través del glomérulo hacia los tubos proximales.

mecanismo de contracorriente Proceso mediante el cual dos corrientes de direcciones opuestas intercambian materiales. En el riñón la orina y la sangre forman corrientes opuestas y este mecanismo permite la reabsorción de sustancias.

médula renal Parte interna del riñón que contiene mayormente túbulos colectores y asa de Henle.

micción Acto de orinar.



microalbuminuria Aumento de la excreción urinaria de albúmina a bajo grado, con tiras reactivas negativas.

nefrón Unidad funcional del riñón constituida por el glomérulo, la cápsula de Bowman, el Túbulo contorneado proximal las ramas ascendentes y descendentes del asa de Henle y los túbulos colectores.

oliguria La formación de pequeñas cantidades de orina.

orina Líquido excretado por el riñón que contiene sustancias disueltas.

piuria Presencia de pus (líquido inflamatorio con leucocitos y células muertas) en la orina.

proteína de Bence Jones Porción de cadenas livianas de una inmunoglobulina monoclonal producida en exceso y excretada en la orina en los pacientes con mieloma múltiple.

proteinuria Presencia de proteína en la orina.

rama ascendente Porción recta del asa de Henle en la que la orina asciende hacia los tubos contorneados distales. El líquido disminuye en osmolaridad debido a la pérdida de cloruro (más de sodio).

rama descendente Porción recta del asa de Henle en la cual la orina en formación fluye hacia debajo del tubo contorneado proximal. Esta porción del asa de Henle es libremente permeable al agua, la cual abandona la orina a este nivel.

renina Enzima formada por el aparato yuxtaglomerular renal; convierte el angiotensinógeno del plasma en angiotensina I.

túbulo colector Última porción del nefrón que conecta el túbulo distal con los conductos mayores, los cuales a su vez vacían en el uréter. Los procesos finales e concentración bajo la acción de la HAD se producen a ese nivel.

túbulo contorneado distal Túbulo contorneado que conecta el asa de Henle ascendente con el túbulo colector, posee funciones secretorias y reabsorbativas como parte de la formación final de la orina y del proceso de acidificación.

túbulo proximal Túbulo que comienza a nivel del glomérulo y se une con la rama descendente del asa de Henle. Posee funciones de secreción y reabsorción como parte de los mecanismos de formación de orina.

umbral renal Concentración plasmática de una sustancia por encima de la cual dicha sustancia está presente en la orina.

uretra Tubo membranoso a través del cual la orina pasa desde la vejiga hasta el exterior del organismo.

vejiga Bolsa donde se acumula la orina antes de su micción.

Anatomía del Riñón

Anatomía macroscópica

Los riñones son órganos pares situados en la pared posterior del abdomen a ambos lados de la columna vertebral. Debajo de la cápsula de tejido fibroso que incluye los riñones se ubica la corteza, que contiene los glomérulos. La porción interna del riñón, la médula,



contiene los tubos colectores. Un corte vertical del riñón se muestra en el lado izquierdo de la Fig. 26-1.

El sistema urinario se ilustra en el lado derecho de la Fig. 26-1. La pelvis renal disminuye rápidamente su calibre y se une dentro del uréter. Cada uréter desciende al abdomen al costado de la columna vertebral para unirse en la vejiga. La vejiga provee un almacenamiento temporal de orina, que es eventualmente vertida a través de la uretra al exterior.

Anatomía microscópica

Cada riñón está constituido por aproximadamente 1 millón de unidades funcionales, o *nefronas*. Las partes componentes de la nefrona están ilustradas en la Fig. 26-2. La nefrona comienza con el glomérulo, que es un penacho de capilares que se forman desde la arteriola aferente (entrada) y son drenados por la arteriola eferente de menor tamaño (salida). El glomérulo está rodeado por la cápsula de Bowman, la cual está formada por la porción final dilatada ciega del túbulo renal. El túbulo contorneado proximal recorre un curso tortuoso a través de la corteza, entrando en la médula y formando primero la rama descendente del asa de Henle y luego la rama ascendente del asa de Henle. La sección gruesa de la rama ascendente del asa de Henle vuelve a entrar en la corteza, formando el túbulo contorneado distal. La salida de dos o más túbulos distales marca el comienzo de un túbulo colector. Como los túbulos colectores descienden a través de la corteza y médula, reciben el efluente de una docena o más túbulos distales. Los túbulos colectores se unen y aumentan su tamaño así como pasan hacia abajo en la médula. Los túbulos de cada pirámide se unen para formar un túbulo central, el cual vacía a través de la papila en unos cálices menores, eventualmente evacuando en la pelvis renal.

Fisiología Renal

El riñón es el principal regulador de todos los fluidos corporales y es primariamente responsable de mantener la homeostasis, o equilibrio entre fluido y electrolitos en el organismo. El riñón tiene seis funciones principales:

1. Formación de la orina
2. Regulación del equilibrio hidroelectrolítico
3. Regulación del equilibrio ácido-base
4. Excreción de los productos de desecho del metabolismo proteico
5. Función hormonal
6. Conservación proteica

El riñón es capaz de efectuar estas funciones complejas porque aproximadamente el 25% del volumen de sangre bombeado por el corazón en la circulación sistémica circula a través de los riñones; por lo tanto los riñones, que constituyen cerca del 0.5% del peso total del cuerpo, reciben un cuarto de la salida cardíaca.

Formación de la Orina

La función principal de los riñones es la remoción de productos potencialmente tóxicos y es realizada mediante la formación de la orina. Los procesos básicos involucrados en la formación de la orina son *filtración*, *reabsorción* y *secreción*. Los riñones filtran grandes volúmenes de plasma, reabsorben la mayoría de lo que es filtrado, y queda para la eliminación

una solución concentrada de desechos metabólicos llamada orina. En individuos sanos, altamente sensibles a fluctuaciones de la dieta e ingesta de fluido y electrolito, los riñones compensan cualquier cambio variando el volumen y la consistencia de la orina.

Filtración glomerular.

Por los riñones pasan entre 1000 y 1500 mL de sangre por minuto. El glomérulo tiene una membrana basal semipermeable que permite el libre pasaje de agua y electrolitos pero es relativamente impermeable a moléculas grandes. La arquitectura de la pared capilar glomerular humana esta ilustrada en la Fig.26-3. En el proceso de transferencia desde el lumen capilar (CL) al espacio de Bowman, o espacio urinario (US), el agua, los solutos, y las macromoléculas deben atravesar tres capas: (1) La pared endotelial citoplasmática (En), conteniendo numerosas ventanas con un diámetro medio de 70 nm; (2) La membrana basal (B) con un espesor de 320 nm; y (3) La capa del proceso base (F), están separados entre 25 y 60 nm cada uno por poros. Se muestra también el citoplasma (EpCy) y el núcleo (EpN) de una célula epitelial. En los capilares glomerulares la presión hidrostática es aproximadamente tres veces mayor que la presión en otros capilares. Como resultado de esta gran presión, las sustancias son filtradas a través de la membrana semipermeable en la cápsula de Bowman a una velocidad aproximada de 130 mL/min; esto es conocido como la *velocidad de filtración glomerular* (IFG). Las células y proteínas plasmáticas de gran peso molecular son incapaces de pasar a través de la membrana semipermeable. Por lo tanto el filtrado glomerular es esencialmente plasma sin las proteínas. La IFG es un parámetro extremadamente importante en el estudio de la fisiología renal y en la evaluación clínica de la función renal. En una persona promedio sana, se forman por día más de 187,000 mL de filtrado. La excreción normal de orina es alrededor de 1500 mL por día, lo cual es solamente cerca del 1% de la cantidad de filtrado formado; por lo tanto el otro 99% debe ser reabsorbido.

Túbulo proximal.

Las células del túbulo proximal desempeñan una variedad de roles fisiológicos. Aproximadamente un 80% de la sal y el agua son reabsorbidos desde el filtrado glomerular en el túbulo proximal. Toda la glucosa filtrada y la mayoría de los aminoácidos filtrados son normalmente reabsorbidos aquí. Las proteínas de bajo peso molecular, urea, ácido úrico, bicarbonato, fosfato, cloruro, potasio, magnesio, y calcio son reabsorbidos en grado variable. Una variedad de ácidos orgánicos y bases, así como también iones hidrógeno y amoníaco, se secretan en el fluido tubular por las células tubulares. En condiciones normales, la glucosa no es excretada en la orina; todo lo que filtra se reabsorbe. Cuando la concentración plasmática de glucosa esta aumentada por encima de un nivel crítico, llamado el *umbral plasmático renal*, el máximo tubular para la glucosa es excedido y la glucosa aparece en la orina. Cuanto mayor es la concentración de glucosa plasmática, mayor es la cantidad excretada por la orina. También existen umbrales renales plasmáticos para los iones fosfato y bicarbonato.

La mayoría de la energía metabólica consumida por el riñón es usada para promover la *reabsorción activa*. La reabsorción activa puede producir el movimiento neto de una sustancia contra un gradiente de concentración o eléctrico y por lo tanto requiere gasto de energía para el transporte de células. La reabsorción activa de glucosa, aminoácidos, proteínas de bajo peso molecular, ácido úrico, sodio, potasio, magnesio, calcio, cloruro, y bicarbonato está regulada por el riñón de acuerdo a los niveles de estas sustancias en la sangre



y la necesidad del organismo. La *reabsorción pasiva* ocurre cuando una sustancia se mueve por difusión simple como el resultado del gradiente de concentración químico o eléctrico, y no se involucra energía celular en el proceso. El agua, urea, y cloruro son reabsorbido de esta forma.

La secreción tubular, que transporta sustancias al lumen tubular (que es, en la dirección opuesta a la reabsorción tubular), también puede ser un proceso activo o pasivo. Las sustancias que son transportadas desde la sangre a los túbulos y excretadas en la orina incluyen potasio, iones hidrógeno, amoníaco, ácido úrico, y ciertas drogas, como la penicilina. La Tabla 26-1 da una idea de la magnitud e importancia de estos mecanismos de reabsorción.

Asa de Henle.

La rama descendente del asa de Henle es altamente permeable al agua. En la médula, el asa de Henle desciende en un medio progresivamente hipertónico a medida que se aproxima a la papila. Hay una reabsorción pasiva de agua en respuesta a este gradiente osmótico, dejando la presunta orina altamente concentrada en el fondo del asa. La rama ascendente es relativamente impermeable al pasaje de agua pero reabsorbe activamente sodio y cloruro. Este segmento de la nefrona es a menudo llamado el *segmento dilutorio* porque la remoción de la sal con pequeño pasaje de agua desde el contenido tubular disminuye la sal y la concentración osmótica, diluyendo en efecto el fluido tubular. La rama gruesa ascendente del asa de Henle transfiere cloruro de sodio activamente desde su luz hacia el fluido intersticial. El fluido tubular en su luz se vuelve hipotónico, y el fluido intersticial hipertónico. Este fenómeno es conocido como el *mecanismo de contracorriente*. Una serie de mecanismos sucesivos producen el atrapamiento de cloruro de sodio en el líquido intersticial medular. A medida que el fluido isotónico en la rama descendente alcanza el área en la cual la rama ascendente está bombeando sodio, se vuelve ligeramente hipertónico debido al movimiento de agua al intersticio hipertónico. El primer paso se repite, y nuevamente, a medida que se agrega más cloruro de sodio al intersticio por la rama ascendente, se produce una mayor salida de agua de la rama descendente.

Túbulo contorneado distal.

Una pequeña fracción de sodio, cloruro, y agua filtrado es reabsorbida en el túbulo distal. El túbulo distal responde a la hormona antidiurética (HAD), y por lo tanto su permeabilidad al agua es alta en presencia de la hormona y baja en su ausencia. El potasio puede ser reabsorbido o segregado en el túbulo distal. La Aldosterona estimula la reabsorción de sodio y la secreción de potasio en el túbulo distal. También ocurre la secreción de hidrógeno, amoníaco, y ácido úrico y la reabsorción de bicarbonato, pero hay un pequeño transporte de sustancias orgánicas. Este segmento de la nefrona tiene una baja permeabilidad a la urea.

Túbulo colector.

La HAD controla la permeabilidad del agua del túbulo colector a lo largo de su longitud. En la presencia de la hormona, el fluido tubular hipotónico entra al túbulo perdiendo agua. El sodio y cloruro son reabsorbidos por el túbulo colector, con el transporte de sodio estimulado por la aldosterona. El potasio, hidrógeno, y amonio son también reabsorbidos por el túbulo colector. Cuando la HAD está presente, la velocidad de reabsorción de agua excede

la velocidad de reabsorción de soluto, y la concentración de sodio y cloruro aumenta en la presunta orina. El túbulo colector es relativamente impermeable a la urea.

Regulación del equilibrio hidroelectrolítico

Agua.

El agua es el componente más abundante del cuerpo humano, constituyendo aproximadamente un 60% del peso corporal. El agua corporal, y por lo tanto el peso corporal, permanece bastante constante de día a día en personas normales, a pesar de las amplias fluctuaciones en la ingesta de fluidos y sal. [refs\(530\)](#) Una de las propiedades más remarcables del riñón humano es su capacidad de elaborar orina, más concentrada o más diluida que el plasma del cual deriva. Cuando el organismo necesita conservar el agua, como en la deshidratación, el mecanismo de concentración opera al máximo, y la osmolalidad de la orina aumenta a cerca de 1200 mOsm/kg. Inversamente, cuando hay un exceso de agua en el organismo, el flujo de orina aumenta, y el mecanismo de dilución reduce la osmolalidad urinaria hasta 50 mOsm/kg. La capacidad del riñón para formar orina de tan variadas osmolalidades le permite regular la concentración de solutos y por lo tanto la osmolalidad de los fluidos corporales dentro de estrechos límites fisiológicos, a pesar de las amplias fluctuaciones en la ingesta de sal y agua. [refs\(531\)](#) El balance hídrico está controlado principalmente por la ingesta voluntaria (que es regulada por el centro de la sed en el hipotálamo) y la pérdida urinaria de agua. El control de la pérdida urinaria de agua es el mecanismo automático principal por el cual el agua corporal está regulada. En estado de deshidratación la orina es concentrada, por reabsorción de agua sin solutos. Inversamente, la orina es diluida cuando el riñón reabsorbe solutos sin agua.

Sodio.

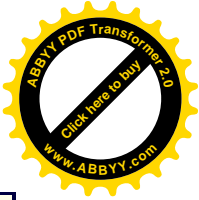
El sodio es el principal catión encontrado en el fluido extracelular. El sodio es filtrado libremente a través de glomérulo y activamente reabsorbido por los túbulos. La reabsorción de sodio es muy importante porque ella afecta la regulación de muchos otros electrolitos. La reabsorción activa del ion sodio en el túbulo proximal resulta en el transporte pasivo de cloruro y bicarbonato como contraiones y en la reabsorción pasiva de agua. En personas normales, la excreción diaria urinaria de sodio fluctúa ampliamente de acuerdo a la ingesta dietaria, por este medio manteniendo el contenido de sodio corporal remarcablemente constante. En la persona normal, más del 99% de la carga filtrada de sodio es reabsorbida por los riñones. La reabsorción de sodio por la nefrona está controlada por el sistema renina-angiotensina-aldosterona (ver Capítulos 24 y 31). [refs\(532\)](#)

Cloruro.

La concentración de cloruro en el fluido extracelular iguala a la de sodio y está influenciada por los mismos factores. Sin embargo, la reabsorción de cloruro es pasiva en el túbulo proximal y probablemente activa en el túbulo distal y colector.

Potasio.

El potasio es el principal catión del fluido intracelular. El mantenimiento de un nivel normal de potasio es esencial para la vida de las células. La distribución de potasio es tal que el 90% del potasio total corporal es intracelular y solamente el 2% es extracelular. La relación alta de potasio intracelular-extracelular es mantenida por la bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$. [refs\(533\)](#) Las



personas normales mantienen el potasio balanceado excretando diariamente una cantidad de potasio igual a la cantidad ingerida menos la pequeña cantidad eliminada en las heces y sudor. La función renal es el principal mecanismo por el cual el potasio corporal es regulado. El potasio es filtrado libremente en el glomérulo, y ocurre reabsorción tubular activa a través de la nefrona, excepto en la rama descendente del asa de Henle. Solamente cerca del 10% del potasio filtrado entra al túbulo distal. El túbulo distal y el túbulo colector son capaces de secretar y reabsorber potasio, regulando así la excreción de potasio.[ref\(534\)](#) La hormona aldosterona, que estimula la reabsorción tubular de sodio, simultáneamente mejora la secreción de potasio en el túbulo distal.[refs\(535\)](#)

Calcio.

La reabsorción de calcio en el túbulo proximal iguala a la de sodio y agua. El mantenimiento de la homeostasis del calcio depende del balance entre la ingesta y la pérdida de calcio. El organismo pierde calcio en la orina, por el tracto gastrointestinal, y por el sudor. El balance del calcio es logrado por el control de la absorción de calcio mas que por la regulación de la excreción. El porcentaje de calcio ingerido absorbido disminuye con el aumento del contenido de calcio en la dieta, y por eso la cantidad absorbida puede mantenerse relativamente constante. Un leve aumento en la absorción que ocurre con una dieta alta en calcio es reflejado en una aumentada excreción renal.[ref\(536\)](#)

Fósforo.

Sobre un amplio rango de ingestas dietarias, aproximadamente dos tercios del fósforo ingerido es absorbido hacia la circulación sanguínea. El mantenimiento del balance del fósforo es realizado por la excreción renal.[refs\(537\)](#) La reabsorción tubular proximal de fosfato inorgánico es normalmente cerca de 90% de la carga filtrada. La hormona paratiroidea deprime la reabsorción tubular renal de fosfato inorgánico. En una progresiva falla renal crónica, hay un progresivo aumento en el nivel de fósforo del suero.[ref\(538\)](#)

Magnesio.

La filtración de magnesio en el glomérulo y su reabsorción desde el túbulo proximal iguala a la del calcio y también esta bajo la influencia de la hormona paratiroidea. Una elevación moderada de la concentración plasmática de magnesio ocurre en pacientes con falla renal crónica avanzada.[ref\(539\)](#)

Equilibrio ácido-base

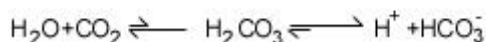
Cada día son producidos en el organismo ácidos, productos de desecho. Si ellos no fueran desechados eficientemente, se acumularían y causarían daño celular. El pH del organismo está controlado por tres sistemas: buffers ácido-base, los pulmones, y los riñones. (Ver capítulo 25).

Excreción de iones hidrógeno.

En sujetos con una dieta normal, son generados cada día entre 50 y 100 mEq de hidrogeniones.[ref\(540\)](#) Para prevenir una progresiva acidosis metabólica, estos hidrogeniones son excretados en la orina. Los hidrogeniones son generados en las células de los túbulos proximal, distal y colector como un resultado de la formación de ácido carbónico por la



enzima anhidrasa carbónica (AC). Estos hidrogeniones son secretados por las células hacia el lumen: [ref\(541\)](#)

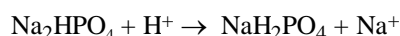


Ec.26-1

El rol de los riñones en el mantenimiento del equilibrio ácido-base se centra en la generación de bicarbonato. Los hidrogeniones son excretados en la orina mientras iones bicarbonatos nuevamente generados pasan desde las células tubulares a la sangre a la misma velocidad que el bicarbonato es consumido por los procesos metabólicos. [ref\(542\)](#) Cuatro mecanismos existen para manejar los hidrogeniones que han sido secretados al fluido tubular.

Reacción con los iones bicarbonatos filtrados. El bicarbonato es completamente filtrable en el glomérulo. En el lumen tubular, los hidrogeniones excretados se combinan con el bicarbonato filtrado para formar ácido carbónico, el cual se descompone en agua y dióxido de carbono, este difunde hacia la célula, donde es convertido por la AC en ácido carbónico para generar otro hidrogenión. Un ion bicarbonato es regenerado por cada hidrogenión que es secretado en el lumen tubular. El ion bicarbonato es reabsorbido hacia la sangre como bicarbonato de sodio, conservando así la mayoría del bicarbonato filtrado. El umbral renal para bicarbonato es 28 mM; con un nivel plasmático por debajo de este, todo el bicarbonato filtrado es reabsorbido.

Reacción con los buffers filtrados para formar ácidos titulables. El monohidrogenión fosfato inorgánico está presente en el lumen tubular como sal disódica. Los hidrogeniones secretados reaccionan con el fosfato filtrado, liberando sodio que se combina con el bicarbonato; el bicarbonato de sodio es reabsorbido, y el dihidrógeno fosfato es excretado:

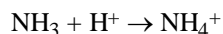
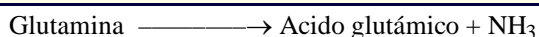


Ec. 26-2

Los hidrogeniones se combinan con el fosfato para formar ácido titulable. La velocidad de excreción de ácido titulable está limitada por la carga filtrada de amortiguador y no puede aumentar mucho en la acidosis. El menor pH posible en orina es 4.4.

Reacción con el amoníaco secretado para formar ion amonio. El filtrado glomerular no contiene amoníaco. Este compuesto es sintetizado en las células del túbulo renal por desaminación de glutamina en presencia de glutaminasa. [ref\(543\)](#) El amoníaco difunde hacia el fluido tubular, donde reacciona con un hidrogenión secretado para formar un ion amonio. Una vez más este resulta en la adición de nuevo bicarbonato a la sangre. La adaptación renal más importante ante la acidosis es la excreción aumentada de iones amonio: [ref\(544\)](#)

Glutaminasa



Ec. 26-3

Excreción como hidrogeniones libres. Solamente cantidades despreciables de hidrogeniones son manejados así por los riñones.

Excreción de los productos de desecho nitrogenados

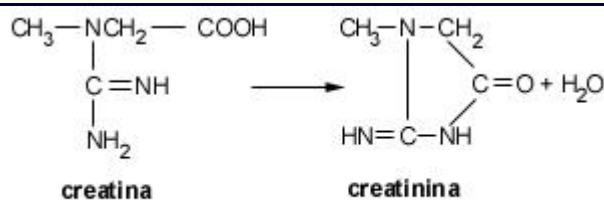
Una de las principales funciones del riñón es la eliminación de productos nitrogenados del catabolismo de las proteínas. Las enormes reservas del riñón para la excreción de los productos del catabolismo proteico se manifiestan en el hecho de que las concentraciones sanguíneas de estos productos no están elevadas en una falla renal hasta que la función renal se reduce a menos que la mitad de lo normal. [ref\(545\)](#)

Urea.

A medida que los aminoácidos son desaminados, se produce el amoníaco. El desarrollo de niveles tóxicos de amoníaco en la sangre se previene por la conversión de amoníaco en urea. Este proceso tiene lugar en el hígado. La concentración de urea en la sangre es determinada como nitrógeno ureico sanguíneo (BUN). La producción de urea y el BUN están aumentados cuando más aminoácidos son metabolizados en el hígado. Esto puede ocurrir con una dieta alta en proteínas, destrucción de tejido, o disminución de la síntesis proteica. En contraste, la producción de urea y el BUN están reducidos con la presencia de una ingesta baja en proteínas y una severa enfermedad del hígado. La producción de urea excede la excreción renal en personas normales. La urea remanente es degradada a iones amonio por bacterias intestinales. La urea es rápidamente filtrada, pero aproximadamente entre el 40% y 50% de la urea filtrada es normalmente reabsorbida por el túbulo proximal. Como muchos factores pueden influenciar el nivel del BUN en presencia de IFG constante, por ello el BUN es un indicador menos específico de la función renal y no debería usarse para ese fin.

Creatinina.

Los niveles de creatinina sérica y la excreción urinaria de creatinina son una función de la masa muscular en personas normales y muestran pequeña respuesta a cambios en la dieta. [ref\(546\)](#) La creatinina deriva de la deshidratación no enzimática de la creatina en el músculo esquelético. La cantidad de creatina por unidad de masa muscular es constante, y así la velocidad de degradación espontánea de la creatina es también constante. Como resultado de observaciones consecutivas en sujetos normales, la concentración de creatinina plasmática es muy estable, variando menos de un 10% por día. Como la concentración de creatinina sérica es un reflejo directo de la masa muscular, el nivel sérico es mayor en hombres que en mujeres. La creatinina es filtrada libremente en el glomérulo y no es reabsorbida por los túbulos. Una pequeña cantidad de creatinina en la orina final deriva de la secreción tubular. Debido a estas propiedades de la creatinina, la depuración de creatinina puede ser usado para estimar la IFG (ver pruebas de la función glomerular, pág. 493 más adelante):



Ec. 26-4

Ácido úrico.

El ácido úrico deriva de la oxidación de las bases purínicas. Los niveles plasmáticos de ácido úrico son bastante variables y son mayores en hombres que en mujeres. Los uratos plasmáticos son completamente filtrables, y ocurre resorción en el túbulo proximal y secreción en el túbulo distal. Con una avanzada falla renal crónica hay un aumento progresivo en el nivel de ácido úrico plasmático.

Función hormonal

Los riñones tienen importantes funciones metabólicas y endócrinas. En esta sección se estudia al riñón como un órgano endócrino.[ref\(547\)](#)

Metabolismo de la Vitamina D.

En el metabolismo de la Vitamina D el riñón produce la principal hormona biológicamente activa 1,25-dihidroxicolecalciferol.[ref\(548\)](#) La enzima responsable de la producción del 1,25-dihidroxicolecalciferol está presente solamente en la mitocondria de la corteza renal. (Ver capítulo 28).

Renina.

El riñón libera renina en respuesta a una disminución del volumen del fluido extracelular. Esto resulta en la estimulación del sistema renina-angiotensina- aldosterona, con la conservación subsiguiente de sodio y agua. ((ver Capítulos 24 y 31)).

Eritropoyetina.

Los riñones juegan un rol importante en la producción y liberación de eritropoyetina, una hormona que estimula la producción de los glóbulos rojos. El rol central de los riñones en la producción de eritropoyetina explica la anemia asociada con la falla renal crónica.[ref\(549\)](#)

Conservación de proteínas.

Bajo condiciones fisiológicas normales, el riñón ayuda a mantener la homeostasis de las proteínas corporales. En el hombre son filtrados cada día por los glomérulos 180 L de plasma, cada litro contiene 70 g de proteína.[ref\(550\)](#) Sin un mecanismo de conservación eficiente, las proteínas corporales almacenadas se reducirían rápidamente. Aún la orina normal tiene menos de 200 mg de proteínas por día, con solamente un mínimo porcentaje de los 12,600 g que pasan a través del glomérulo diariamente.[ref\(551\)](#) La mayoría de las proteínas filtradas son absorbidas por el túbulo proximal y regresan a la circulación. La mayoría de las proteínas plasmáticas, excepto las de peso molecular muy alto, se encuentran en la orina. La excreción

de albúmina es menor que 20 mg/día.[ref\(552\)](#) Muchas proteínas de origen no sérico son también encontradas en la orina. Una de ellas, es uromucoide o mucoproteína de Tamm-Horsfall, es la proteína predominante en la orina normal, con una excreción diaria de cerca de 40 mg.[ref\(553\)](#) Esta mucoproteína de alto peso molecular es excretada por las células del túbulo distal y colector. Las tiras reactivas comercialmente disponibles (Albustix) tienen un uso generalizado y son precisas para una evaluación rápida de la concentración urinaria de proteínas.

Condiciones Patológicas del Riñón

Hay muchos síndromes que solos o en combinación permiten sospechar una posible enfermedad renal. Estos han sido notablemente descritos por Coe.[ref\(554\)](#)

Glomerulonefritis aguda

La glomerulonefritis aguda es una inflamación aguda del glomérulo, resultando en oliguria, hematuria, aumento de los niveles séricos de BUN y creatinina, disminución de la IFG, formación de edema e hipertensión. La presencia de glóbulos rojos en la orina (hematuria) por si solos no es evidencia suficiente de glomerulonefritis aguda, pues la sangre puede originarse desde otra parte del riñón o del tracto urinario. La presencia de cilindros de glóbulos rojos en la orina indican inflamación glomerular y es un hallazgo de gran importancia. Otras anormalidades presentes en la nefritis aguda incluyen proteinuria y anemia.

Síndrome nefrótico

El síndrome nefrótico ha sido clásicamente definido como una entidad clínica caracterizada por proteinuria masiva, edema, hipoalbuminemia, hiperlipidemia, y lipiduria.[ref\(555\)](#) Este síndrome, el cual puede tener muchos causas, se caracteriza por una aumentada permeabilidad de la membrana glomerular que resulta en una proteinuria masiva y excreción de grasas corporales. Las velocidades de excreción proteicas son usualmente mayores que 2 o 3 g/día con la ausencia de una depresión de la IFG. Hematuria y oliguria pueden estar presentes. Las causas del síndrome nefrótico se ilustran en el siguiente cuadro. Como resultado de la pérdida masiva de proteínas séricas en la orina, primariamente albúmina, la concentración plasmática de proteínas decrece, con una concomitante reducción en la presión oncótica plasmática. Esto resulta en un movimiento de fluido desde el espacio vascular al intersticial con la consecuente formación de edema.

Causas del Síndrome Nefrótico
Asociado con varias formas de glomerulonefritis
Asociado con procesos de enfermedad generalizada
Amiloidosis
Carcinoma
Lupus eritematoso sistémico
Glomeruloesclerosis diabética
Poliartritis nodosa
Asociado con desórdenes mecánicos o de circulación
Trombosis venosa renal



	Pericarditis constrictiva
	Asociado con infecciones
	Sífilis
	Malaria
	Endocarditis bacteriana subaguda
	Asociado con toxinas y alergen
	Penicilamina
	Sales de oro
	Picadura de abeja
	Enfermedad del suero
	Diversos
	Preclampsia severa
	Rechazo de transplante

Enfermedad tubular

En algunos desórdenes de la función tubular renal, la depresión en la función renal no puede ser explicada por la reducción en la IFG. Defectos de la función tubular pueden resultar en una deprimida secreción o reabsorción de sustancias bioquímicas específicos o deterioro de los mecanismos de concentración y dilución urinaria. La acidosis tubular renal (ATR) es el desorden clínico mas importante de la función tubular.[ref\(556\)](#) Hay dos tipos principales de ATR: (1) ATR proximal, que es un resultado de la reducción en la reabsorción tubular proximal de bicarbonato y causa *acidosis hiperclorémica*, y (2) ATR distal, en la cual hay una incapacidad de las células tubulares de crear y mantener la diferencia usual de pH entre el fluido tubular y la sangre. Fallas de los mecanismos secretorios distal o proximal ocurren en varios estados de enfermedad. La falla en la reabsorción de bicarbonato del túbulo proximal causa acidosis porque mas bicarbonato sobrepasa la baja capacidad de reabsorción del mecanismo distal. La pérdida de álcali en la orina produce que la sangre se vuelva acidótica. Los defectos en la secreción de potasio y ácido úrico pueden resultar en elevación de los niveles séricos de potasio y ácido úrico que no pueden ser explicados por la reducción en la IFG. Los desórdenes de reabsorción de los túbulos proximales puede resultar en hipouricemia, hipofosfatemia, aminoaciduria, y glucosuria renal. El síndrome de Fanconi es un grupo de defectos renales que resultan en glucosuria, aminoaciduria, hipofosfatemia, y acidosis tubular renal. La proteinuria tubular puede ocurrir como un resultado de un defecto tubular en el manejo de proteínas. En la proteinuria tubular son excretados menos de 2 g/día de proteínas. Desórdenes en la concentración y dilución urinaria ocurren en todas las enfermedades renales como la IFG falla considerablemente, pero ocasionalmente este desorden vuelve la presentación clínica extrema y dominante.[ref\(557\)](#)

Infecciones del tracto urinario

Las infecciones del tracto urinario pueden ocurrir en la vejiga (*cistitis*) o pueden involucrar los riñones (*pielonefritis*). La presencia de una concentración bacteriana urinaria de más de 100,000 colonias/mL es diagnóstico de una infección del tracto urinario. En una infección del tracto urinario hay un elevado número de glóbulos blancos en la orina. La presencia de glóbulos blancos fundidos indica una pielonefritis. Puede estar presente también en la orina un elevado número de glóbulos rojos.



Enfermedades vasculares

Hipertensión.

La hipertensión duradera y severa puede resultar en un daño renal progresivo y en insuficiencia renal crónica (nefroesclerosis hipertensiva). En contraste, la hipertensión puede estar causada por la retención de sodio y agua que ocurre en la falla renal crónica, glomerulonefritis aguda, y en el síndrome nefrótico (hipertensión volumen dependiente), o puede ocurrir como resultado de una liberación aumentada de renina desde los riñones dañados crónicamente (hipertensión renina dependiente).

Enfermedad arteriolar.

La enfermedad de las pequeñas arterias de los riñones (arteritis) puede ocurrir en asociación con procesos de enfermedad generalizada afectando el riñón, como un lupus eritematoso sistémico, poliartritis nodosa, y esclerosis sistémica progresiva (escleroderma). Estas enfermedades pueden resultar en las anomalías clínicas y bioquímicas vistas en la glomerulonefritis aguda, el síndrome nefrótico, o insuficiencia renal crónica.

Trombosis venosa renal.

La trombosis de las venas renales resulta en una proteinuria masiva y el síndrome nefrótico. Pueden acompañar la proteinuria, hipertensión, edema, hematuria, y función renal deteriorada.

Diabetes mellitus

La diabetes mellitus resulta en una amplia variedad de anomalías en la función renal. Las fases tempranas de la enfermedad se manifiestan por la presencia de pronunciada glucosuria, poliuria, y nocturia como resultado de la diuresis osmótica causada por la carga de glucosa. En la diabetes insulina dependiente (diabetes mellitus tipo I), la enfermedad renal es la principal causa de muerte. En la diabetes juvenil, una proteinuria manifiesta se desarrolla aproximadamente 17 años después que el diagnóstico fue hecho, la hipertensión se desarrolla luego de 1 o 2 años luego, y la insuficiencia renal crónica es vista luego de otro año.^{[ref\(558\)](#)} La excreción de proteínas, particularmente albúmina y IgG, están aumentadas en el curso temprano de esta enfermedad. Una excreción urinaria de albúmina en el rango de 50 a 200 mg/24 hr es usualmente predictivo de nefropatía diabética.^{[ref\(559\)](#)} El nivel del valor de excreción de albúmina se ha mostrado estar incrementado con la edad y duración de la enfermedad luego de 10 años en pacientes con diabetes mellitus tipo I.^{[ref\(560\)](#)} Un nexo importante también ocurrió con la declinación de la función renal y la elevación de la presión sanguínea. En años recientes, la atención ha sido focalizada en tiras reactivas negativas, excreción de albúmina aumentada en bajo grado, o microalbuminuria. Esta fase latente se ha mostrado ser predictiva de nefropatía clínica y eventual falla renal en pacientes con diabetes mellitus tipo I.^{[refs\(561\)](#)}

Obstrucción del tracto urinario

La obstrucción del tracto urinario bajo es caracterizada por orina residual en la vejiga luego de la micción o retención urinaria, mientras que la presencia de obstrucción del tracto urinario alto es establecida por la demostración de un sistema colector expandido sobre una lesión

constrictiva.^{ref(562)} La obstrucción del tracto urinario bajo esta caracterizada por un flujo urinario lento, dificultad en evacuar la vejiga, vacilación en la iniciación de la micción, y goteo. El daño renal crónico puede ocurrir desde la obstrucción y vaciamiento incompleto de la vejiga incompleto, y se pueden desarrollar los síntomas de insuficiencia renal crónica. Con la obstrucción completa, puede ocurrir oliguria o anuria pueden ocurrir. Se pueden ver también síntomas de infección del tracto urinario. La obstrucción del tracto urinario puede ocurrir como resultado de desórdenes congénitos del tracto urinario bajo, lesiones neoplásicas (hipertrofia prostática benigna, carcinoma de próstata o vejiga, o nodos linfáticos comprimiendo los uréteres), o desórdenes adquiridos (fibrosis retroperitoneal, cálculos renales, o estenosis uretral).

Cálculos renales

Los cálculos renales, o piedras, se ven en combinación con cólico renal, hematuria, y síntomas de infección del tracto urinario u obstrucción. Las piedras renales pueden formarse luego de infecciones del tracto urinario frecuentes por organismos productores de ureasa o cuando la orina está supersaturada por grandes cantidades de calcio, ácido úrico, cisteína, o xantina.

Insuficiencia renal aguda

En la insuficiencia renal aguda hay un deterioro abrupto en la función renal. La insuficiencia renal aguda puede clasificarse como se indica a continuación:

1. Prerenal (ocurre antes que la sangre alcance el riñón) debido a hipovolemia o perfusión pobre como resultado de una falla cardiovascular.
2. Renal (ocurre en el riñón) debido a necrosis tubular aguda, que es la causa más frecuentemente observada de insuficiencia renal aguda, o debido a otras enfermedades renales, provocando rápido deterioro en la función renal, incluyendo obstrucción venosa y arterial.
3. Postrenal (ocurre luego que la orina deja el riñón) debido a obstrucción.

Las causas de insuficiencia renal aguda están mencionadas en el siguiente cuadro. La insuficiencia renal aguda está usualmente acompañada por oliguria o anuria, además, puede ocurrir necrosis tubular aguda no oligúrica. La insuficiencia renal aguda está asociada con variados grados de proteinuria, hematuria, y la presencia de cilindros de glóbulos rojos pegados y otras formas de cilindros formas en la orina. Los niveles séricos de nitrógeno urea y creatinina aumentan rápidamente, y se hace evidente la acidosis metabólica. Dependiendo de la causa, la insuficiencia renal aguda puede progresar a insuficiencia o falla renal crónica, o puede ser seguida por recuperación de la función renal. Muchos pacientes con necrosis tubular aguda se recuperan una vez que la causa agravante ha sido tratada o removida.

Causas de la Insuficiencia Renal Aguda	
Prerenal	Hipovolemia Insuficiencia cardiovascular
Renal	Necrosis tubular aguda

	Glomerulonefritis Vasculitis Nefroesclerosis maligna Obstrucción vascular Arterial Venosa Postrenal Obstrucción del tracto urinario bajo Ruptura de la vejiga

Insuficiencia renal crónica

La insuficiencia renal crónica es un síndrome clínico resultado de la progresiva pérdida de la función renal. Los síntomas de insuficiencia renal crónica resultan no solamente en falla excretora simple sino también de la iniciación de falla regular, falla renal para regular ciertas sustancias, como sodio y agua; falla biosintética, como la inadecuada producción renal de eritropoyetina, resultando en anemia; y excesiva producción de ciertas sustancias normales en respuesta a la descomposición química que ocurre en la insuficiencia renal crónica, como la excesiva producción de hormona paratiroidea.^{ref(563)} Hay cuatro etapas en la enfermedad renal progresiva crónica. En la primer etapa la función renal esta disminuida, pero los niveles de urea y creatinina plasmáticos permanecen normales. Por lo menos un 50% de la función normal debe estar perdida antes que las concentraciones de estos compuestos aumente por encima del rango normal. La segunda etapa se caracteriza por insuficiencia renal leve. La tercer etapa es el desarrollo de una falla renal franca con anemia avanzada, acidosis, y otras manifestaciones clínicas y bioquímicas. La cuarta y final etapa es la uremia, cuando todas las consecuencias de la falla renal se ponen de manifiesto.^{ref(564)} Una clasificación de las causas de insuficiencia renal crónica se muestra en el cuadro siguiente.

Clasificación de las causas de Insuficiencia Renal Crónica
Enfermedad glomerular primaria Glomerulonefritis crónica de varios tipos Lupus eritematoso sistémico Poliartritis nodosa Enfermedad vascular renal Hipertensión maligna Trombosis venosa renal Enfermedad inflamatoria Pielonefritis crónica Tuberculosis Enfermedad metabólica con involucramiento renal Diabetes mellitus Gota Amiloidosis Nefrotoxinas Aminoglucósidos Analgésicos nefropáticos



Envenenamiento crónico por metales
pesados
Hipertrofia obstructiva
Cálculos
Hipertrofia prostática
Anomalías congénitas del tracto urinaria
bajo
Anomalías congénitas de los riñones
Riñones hipoplásticos
Enfermedad renal policística
Diversos
Nefritis radiación crónica
Nefropatía Balkan

Pruebas de la Función Renal

Los riñones desempeñan muchas funciones fisiológicas y excretoras. Por el desempeño de un número relativamente pequeño de pruebas, el médico puede deducir exactamente el estado funcional del riñón.^{ref(565)} El clínico primero determina si existe cualquier significativo deterioro de la función renal y luego evalúa una función renal particular para hacer un diagnóstico específico. En esta sección se discute la evaluación de la función glomerular y tubular y el uroanálisis.

Pruebas de la función glomerular

La función glomerular es más convenientemente medida por la prueba de depuración de creatinina. La depuración se define como el volumen de plasma desde el cual una cantidad medida de sustancia puede ser completamente eliminada en la orina por unidad de tiempo. Esto depende de la concentración plasmática de la sustancia y de su velocidad de excreción, lo que a la vez depende de la IFG y el flujo plasmático renal. La depuración de creatinina es una prueba de la función renal basada en la velocidad de excreción por los riñones de la creatinina producida metabólicamente. La cantidad de creatinina producida por el metabolismo endógeno de creatina es relativamente constante y directamente proporcional a la superficie de área corporal. La cantidad de creatinina presente en la orina depende de la excreción renal. La creatinina es filtrada libremente en los glomérulos y no es reabsorbida por los túbulos. La depuración de creatinina puede por lo tanto ser usado para estimar la IFG. Generalmente, se requiere una recolección de orina de 24 horas. Sin embargo, períodos de recolección menores son aceptables. El tiempo preciso es crítico para esta prueba. La vejiga es vaciada al comienzo del período de la prueba y la orina descartada; toda la orina que pasa consecutivamente durante el tiempo de recolección se guarda en un solo frasco. Se extrae una muestra sanguínea durante el período de recolección urinaria. La depuración de creatinina es calculado por la siguiente fórmula:

$$\text{Depuración de Creatinina (mL/min)} = UV/P$$

Ec. 26-5

Donde U es la creatinina urinaria (mg/L), V es el volumen de orina excretado por minuto (mL/min), y P es la creatinina plasmática (mg/L). El intervalo de referencia normal para la depuración de creatinina corregido por un área corporal de 1.73 m² es entre 90 y 120 mL/min (ver Tabla 26-5). La depuración de creatinina usualmente iguala a los IFG. Sin embargo, a velocidades bajas de filtración, la depuración de creatinina se vuelve cada vez más inexacto.^{ref(566)} La depuración de creatinina es menor en mujeres, ancianos y personas menores. La medida de la depuración de creatinina por recolección de una muestra de tiempo urinario (24 horas) es pesado para el paciente y frecuentemente de desempeño difícil. Resultados inexactos causados por vaciamiento incompleto de vejiga, fracaso en recolectar la muestra entera, y amplia variación intraindividual alteran la utilidad de este procedimiento.^{ref(567)} Han sido desarrolladas numerosas fórmulas y nomogramas para estimar la depuración de creatinina de la concentración de creatinina sérica, por medio de eso evitando la necesidad de recolectar orina. La fórmula más simple y más ampliamente usada es la descrita por Cockcroft y Gault.^{ref(568)}

$$C_{cr} \text{ (hombres)} = \frac{[140 - \text{Edad (años)} \times \text{Peso (kg)}]}{[7.2 \times \text{Creatinina sérica (mg/L)}]}$$

$C_{cr} \text{ (mujeres)} = \text{Resultado de la ecuación superior} \times 0.85$ (basado en un 15% menos de masa muscular en promedio)

Ec. 26-6

La depuración de inulina es el método de elección cuando se requiere la determinación precisa de la IFG.^{ref(569)} La pared capilar glomerular es libremente permeable a la inulina, y esta no es reabsorbida, secretada, o alterada metabólicamente por el túbulo renal. La depuración de creatinina endógeno puede exceder el de inulina en un 30% en individuos sanos. Las principales desventajas en la medida de la depuración de inulina son la necesidad de su administración intravenosa y la dificultad técnica del análisis.

La depuración de urea puede también ser empleado como una medida de la IFG. La urea es libremente filtrada en los glomérulos, y aproximadamente un 40% es reabsorbida en los túbulos. Así, los valores de depuración de urea igualarían el verdadero IFG.

Desde un punto de vista práctico, la depuración de creatinina es usado en medicina clínica como una evaluación de la IFG. Es importante entender que hay un gran margen de reserva en la función renal; más que dos tercios de la IFG se pueden perder en el curso de una enfermedad renal crónica con pocos síntomas clínicos y anormalidades bioquímicas.^{ref(570)} Para una persona cuya creatinina sérica normal es de 7 mg/L, un incremento a 14 mg/L, lo cual es aún definido como dentro del intervalo de referencia para individuos sanos, es indicativo de una falla en la IFG de 50% de lo normal.

Pruebas de la función tubular

Estudios de concentración-dilución.

La evaluación de la capacidad de concentración y dilución del riñón puede proveer el medio más sensible de detectar tempranamente un deterioro en la función renal, ya que la habilidad para concentrar orina y conservar el agua requiere un adecuado IFG, flujo plasmático renal, masa tubular y células tubulares sanas capaces de bombear sal contra un considerable gradiente electroquímico.^{ref(571)} La *densidad* urinaria y *osmolalidad* son usadas

como medidas de la capacidad de concentración y dilución de los túbulos. Mientras la orina no contenga cantidades apreciables de proteína, azúcar, o material exógeno tal como tintura de contraste, la densidad es proporcional a la osmolalidad, y una densidad de 1.032 correspondería a una osmolalidad de 1200 mOsm/kg.^{ref(572)}

El deterioro de la capacidad de concentración es una manifestación relativamente temprana de enfermedad renal crónica y se vuelve evidente antes que aparezcan cambios en otras pruebas funcionales. Sin embargo, no es una prueba específica para la función renal reducida, y cualquier enfermedad que produzca una falla renal crónica, diabetes insípida, o el uso de diuréticos pueden deteriorar la capacidad de concentración renal. La prueba es desarrollada luego de 15 horas de privación de fluidos, y la orina es recogida entonces durante 3 horas. La deshidratación máximamente estimula la secreción endógena de HAD. Bajo estas condiciones la osmolalidad urinaria debería ser por lo menos tres veces la del plasma (286 mOsm/kg). Una densidad de 1.025 o más o una osmolalidad de 850 mOsm/kg o por encima en una de las muestras es aceptada como evidencia de capacidad de concentración dentro del intervalo de referencia normal. Un paciente que posea una capacidad de concentración dentro del intervalo de referencia normal es improbable que tenga una falla renal seria de cualquier tipo.^{ref(573)} Así como la enfermedad renal crónica progresa, la capacidad tubular para concentrar la orina decrece lentamente hasta que la orina tiene la misma densidad que el plasma ultrafiltrado –1.010. Clínicamente la pérdida de la capacidad de concentración se manifiesta por nocturia y poliuria.

Para probar la capacidad de dilución urinaria, se usa el siguiente procedimiento. El paciente vacía la vejiga y se le da de 1000 a 1200 mL de agua. Las muestras de orina son entonces recogidas cada hora por las próximas 4 horas. Bajo estas circunstancias, la densidad urinaria debería disminuir a 1.005 o menos o una osmolalidad menor de 100 mOsm/kg. En los pacientes con enfermedad renal crónica que no son capaces de diluir la orina, hay peligro de sobrecarga de fluido con esta prueba.

En la diabetes insípida, la cual puede provenir por una inadecuada producción de HAD o por insensibilidad de los túbulos renales a la HAD, las paredes tubulares distales son impermeables al agua. Como el sodio es reabsorbido, el fluido dejado detrás puede ser muy diluido. En esta enfermedad la orina básica puede tener una densidad menor de 1.005 y una osmolalidad de 50 mOsm/kg.

Uroanálisis

El uroanálisis es una herramienta indispensable para la evaluación de la enfermedad renal. Puede revelar enfermedad en cualquier parte del tracto urinario. Las observaciones que pueden ser hechas en el uroanálisis estándar incluyen el aspecto de la muestra, pH, densidad, semicuantificación de proteínas, presencia o ausencia de glucosa y cetonas, y un examen microscópico del sedimento urinario centrifugado. La importancia del uroanálisis está indicada en la Tabla 26-2. El examen microscópico del sedimento urinario centrifugado para células, cristales y cilindros debe ser hecho sobre una muestra fresca recientemente obtenida.

Los cilindros son conglomerados de proteínas esbozando la forma de los túbulos renales donde fueron formados. Los cilindros hialinos están compuestos casi exclusivamente por proteínas. Los elementos celulares pueden ser atrapados dentro del cilindro hialino, resultando en la formación de cilindro granular. Cuando hay un proteinuria abundante, la acumulación de proteínas dentro de las células tubulares conduce a la degeneración grasa de



las células y la descamación de las células en la orina, estos aparecen en la orina como cuerpos grasos ovales. En la pielonefritis aguda, los glóbulos blancos se pueden agregar en los túbulos para formar cilindros de pus. Los cilindros de glóbulos rojos son marcadores importantes de inflamación glomerular y deben ser diligentemente buscados cuando se sospecha de cualquier forma de nefritis glomerular.

El examen microscópico del sedimento urinario es completado por la búsqueda de bacterias y cristales. La presencia de cristales en la orina puede ser una pista para el diagnóstico de un tipo específico de cálculo renal. Los hallazgos microscópicos urinarios característicos están indicados en la Tabla 26-3. (Ver capítulo 57).

Alteraciones Bioquímicas en Estados Patológicos

Los cambios que ocurren en los compuestos analizados están discutidos en la sección sobre condiciones patológicas del riñón y resumidos en la Tabla 26-2. En esta sección se examina desde una perspectiva diferente la siguiente pregunta: ¿qué significa el hallazgo de una o un grupo de anormalidades bioquímicas en el diagnóstico de condición patológica del riñón?

Electrolitos séricos (ver también págs.451-457)

Sodio.

El sodio es el catión principal en el fluido extracelular y usualmente tiene una concentración sérica de 136 a 145 mmol/L. El sodio y sus aniones concomitantes son los principales contribuyentes de la osmolalidad del suero. [ref\(574\)](#)

Hiponatremia. La hiponatremia con hipoosmolalidad puede presentarse en la enfermedad renal debido a un volumen incrementado de fluido extracelular por la incapacidad renal de excretar agua. Este estado ocurre en la insuficiencia renal crónica y en el síndrome nefrótico. La hiponatremia con disminución del fluido extracelular, puede estar asociada con el uso de agentes diuréticos y el síndrome de inapropiada secreción de HAD.

Hipernatremia. La hipernatremia, por definición es un déficit relativo de agua, puede ocurrir en pacientes con pérdida de fluido hipotónico. La hipernatremia también ocurre en la diabetes insípida cuando la ingesta oral de fluido no puede mantener relación con la pérdida

Cloruro.

La concentración de cloruro en el fluido extracelular iguala a la de sodio y esta influenciada por los mismos factores. Los desbalances de cloruro ocurren corrientemente con los desbalances de sodio. La hipercloremia ocurre en asociación con la acidosis tubular renal.

Potasio.

El potasio es el principal catión del fluido intracelular.

Hipokalemia. La hipokalemia está usualmente asociada con una manifiesta privación de potasio como resultado de pérdida excesiva de fluidos ricos en potasio. La pérdida de potasio puede ser renal o extrarenal. La excreción renal aumentada de potasio ocurre con agentes diuréticos, prolongado uso de corticoides, aldosterismo primario o secundario, y síndrome de Cushing. La hipokalemia por pérdida de potasio extrarrenal usualmente ocurre en el tracto gastrointestinal y se ve con vómitos prolongados, diarrea,

fístulas del tracto intestinal, y adenomas vellosos del colon.

Hiperkalemia. La hiperkalemia, una emergencia médica aguda, esta usualmente causada por una aumentado rotura celular excediendo la capacidad excretora renal normal o un deterioro de la excreción renal. [ref\(575\)](#) La hiperkalemia puede resultar de (1) aumentada ingesta de potasio, como ocurre con la administración excesiva de potasio oral o intravenoso en el paciente con función renal comprometida; (2) rotura celular, como ocurre con quemaduras extensivas o rabdomiolisis (necrosis muscular aguda); (3) disminución de la excreción de potasio, como ocurre en la insuficiencia renal aguda o crónica, secundario a diuréticos ahorradores de potasio, en insuficiencia adrenal, y en hipoaldosteronismo; o (4) redistribución transcelular de potasio, con acidosis aguda, cetoacidosis diabética, parálisis periódica hiperkalémica familiar, y ciertas drogas (ver capítulo 24 para métodos específicos).

Electrolitos urinarios

Sodio.

Las determinaciones de sodio urinario son diagnósticamente útiles en tres casos clínicos. Primero, en la pérdida de volumen, la medida de la excreción de sodio urinario es útil en la determinación de la ruta de pérdida de sodio. Una baja concentración de sodio urinario (menor que 10 mEq/L) indica una pérdida de sodio extrarrenal, mientras que la presencia de una alta concentración de sodio en la orina indica pérdida de sal renal o insuficiencia adrenal. Segundo, en el diagnóstico diferencial de insuficiencia renal aguda, la excreción urinaria de sodio será menor de 10 mEq/L en pacientes con pérdida de volumen que no tengan enfermedad renal intrínseca y usualmente más de 30 mEq/L en pacientes con necrosis tubular aguda. [ref\(576\)](#) Tercero, en la hiponatremia una baja concentración de sodio urinario (menos de 10 mEq/L) indica una ávida retención renal de sodio, la cual puede ser atribuible a una privación de volumen severa o estado de retención de sodio visto en cirrosis, el síndrome nefrótico, y falla cardíaca congestiva. Cuando la hiponatremia está asociada con la excreción de sodio urinario que iguala o excede la ingesta dietaria de sodio, es probable que la secreción inapropiada de HAD esté presente. [ref\(577\)](#) En estas tres situaciones una concentración de sodio urinario al azar puede rápidamente dar información diagnóstica valiosa (ver Capítulo 24 para métodos específicos).

Cloruro.

La medida de cloruro urinario es de valor clínico solamente en pacientes con alcalosis metabólica persistente que no estén recibiendo diuréticos (ver capítulo 24 para métodos específicos). [ref\(578\)](#)

Potasio.

Los niveles de potasio urinario son útiles en la evaluación de pacientes con hipokalemia inexplicable. [ref\(579\)](#) El hallazgo de una concentración urinaria de potasio de más de 10 mEq/L indica que el riñón es responsable de la pérdida de potasio, mientras una concentración urinaria de potasio de menos de 10 mEq/L con la presencia de hipokalemia es fuertemente sugestiva de que la pérdida de potasio es el tracto gastrointestinal (ver Capítulo 24 para métodos específicos).

Hiato aniónico



Un incrementado anión restante ocurre en la falla renal debido a la retención de aniones sulfato, fosfato, y ácidos orgánicos. (Ver capítulos 24 y 25).

Creatinina, urea, y ácido úrico (ver el texto debajo para los métodos)

Con una insuficiencia renal progresiva hay retención sanguínea de urea, creatinina, y ácido úrico. Normalmente la relación entre nitrógeno ureico sérico y creatinina sérica es entre 10:1 a 20:1. En el caso usual de falla renal, se ve una relación similar. Relaciones mayores que 20:1 ocurren en estados de enfermedad de origen extrarrenal, como azoemia prerrenal, sangrado gastrointestinal, o ingesta excesiva de proteínas con función renal casi deficiente. En contraste, la producción de urea y el BUN están reducidas con la presencia de una baja ingesta de proteínas y una enfermedad severa del hígado. La concentración de ácido úrico sanguíneo aumenta en la falla renal crónica avanzada, pero esto raramente ocurre en la gota clásica.

Calcio y fósforo

En la falla renal crónica hay excreción deteriorada de fosfato, y se produce hiperfosfatemia progresiva. Esto provoca una caída en la concentración de calcio plasmático (hipocalcemia), dando origen a hiperparatiroidismo secundario. El nivel elevado de hormona paratiroidea causa resorción de calcio del hueso, y puede resultar normocalcemia o hipercalcemia. Sin embargo, la hipocalcemia es mas frecuente en uremia, ambas como resultado de la caída reciproca de calcio plasmático como aumento del nivel de fosfato plasmático y debido a la absorción reducida de calcio en el intestino como resultado de la producción deteriorada de 1,25- dihidroxicolecalciferol. [ref\(580\)](#) La hipocalcemia esta también presente en el síndrome nefrótico, como resultado de la hipoalbuminemia. Sin embargo, el nivel de calcio sérico ionizado permanece normal en estas condiciones.

Proteinuria (ver Tabla 26-9 para los métodos)

La proteinuria puede ser de dos tipos. En la proteinuria glomerular grandes cantidades de proteínas de alto peso molecular entran al filtrado glomerular y aparecen en la orina. La proteinuria importante (mas de 2 g/día) ocurre por incrementada permeabilidad glomerular, y la pérdida de proteína puede ser lo suficientemente grande para resultar en un síndrome nefrótico. [ref\(581\)](#) En la proteinuria tubular no esta aumentada la cantidad de proteína filtrada por el glomérulo, pero las proteínas de bajo peso molecular, que son normalmente filtradas, aparecen en grandes cantidades en la orina final porque la reabsorción tubular es incompleta. El deterioro en la reabsorción tubular de las proteínas filtradas resulta en un modesto incremento (1 a 3 g/día) en la excreción urinaria de proteínas de bajo peso molecular y albúmina. [ref\(582\)](#) El aumento fisiológico en la excreción de proteínas ocurre durante el mantenimiento de una postura derecha, luego de ejercicio vigoroso, y en embarazo normal. [ref\(583\)](#)

Enzimas en orina

Las enzimas pueden aparecer en la orina debido a filtración, secreción, o daño tisular. [ref\(584\)](#) Las enzimas de bajo peso molecular, como lisozima y amilasa, aparecen porque ellas son filtradas y no completamente reabsorbidas. Las enzimas de alto peso molecular, como láctico deshidrogenasa, pueden ser excretadas debido a daño renal parenquimal.



Hemoglobina y hematocrito

La anemia es un aspecto común en la falla renal crónica, y su severidad refleja la extensión del deterioro renal.[ref\(585\)](#) La anemia progresiva usualmente ocurre cuando la IFG cae por debajo de 25 mL/min. La anemia de la falla renal crónica es atribuible a (1) producción reducida de eritropoyetina como disminución de la masa renal, (2) inhibidores de la eritropoyetina presentes en el suero de un paciente urémico, (3) reducida supervivencia de los glóbulos rojos en falla renal avanzada, y (4) deficiencia de hierro causada por pérdida sanguínea como resultado del defecto hemostático característico de la falla renal.[ref\(586\)](#)

Métodos de Análisis

Creatinina

Steven C. Kazmierczak

Principios del análisis y uso corriente.

El método Jaffé para el análisis de creatinina (Tabla 26-4, método 1), tiene la distinción de ser el método mas antiguo en química clínica todavía de uso común.[ref\(587\)](#) En 1886, Jaffé describió la reacción de creatinina con picrato alcalino, y en 1904, Folin demostró la utilidad de este ensayo para la medición de creatinina en orina y sangre.[ref\(588\)](#) En la reacción de Jaffé, la creatinina reacciona directamente con el ion picrato bajo condiciones alcalinas para formar un compuesto rojo-anaranjado, llamado complejo de Janovski, con un pico de absorbancia en 520 nm.

Las ventajas de la reacción de Jaffé son su simplicidad y la amplia aceptación clínica ganada sobre años de uso.[ref\(589\)](#) Sin embargo, una desventaja importante de esta reacción es la interferencia importante que ocurre con otras sustancias. Las sustancias informadas que causan una interferencia positiva cuando la reacción original de Jaffé es usada (sin tierra de fuller,) incluyen ácido ascórbico, piruvato, acetona, ácido acético, levulosa, glucosa, aminohipurato, ácido úrico, proteína, antibiótico cefalosporina, y nitrometano.[refs\(590\)](#) La bilirrubina u otros productos de degradación de la hemoglobina, causan un sesgo negativo por su oxidación en base fuerte a compuestos sin color. La disminución resultante en el color blanco disminuye la absorbancia medida y es interpretado como una concentración de creatinina más baja. Este sesgo negativo es también visto en análisis cinéticos de creatinina.[ref\(591\)](#)

Las sustancias como glucosa, ascorbato, y ácido úrico interfieren pero levemente reduciendo el picrato alcalino, mientras que otros compuestos, como cetoácidos, piruvato, proteínas, y drogas cefalosporinas reaccionan con el picrato alcalino formando complejos coloreados.[refs\(592\)](#) La presencia de estos compuestos cromógenos no creatinina puede causar una sobreestimación de las concentraciones de creatinina reales en el suero en más de un 20%. Sin embargo, los cromógenos no creatinina no interfieren significativamente con las medidas de creatinina hechas en orina.

La contaminación bacteriana, que puede ocurrir en muestras almacenadas por largos períodos de tiempo, se ha encontrado también que disminuyen los valores medidos de creatinina usando la reacción de Jaffé.[ref\(593\)](#) El mecanismo de esta interferencia parecería ser la producción bacteriana de una sustancia que retarda la velocidad de la reacción de Jaffé. En



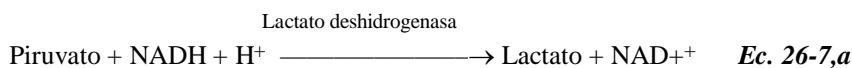
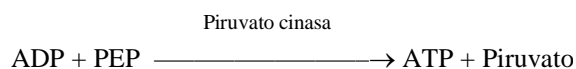
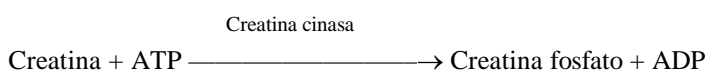
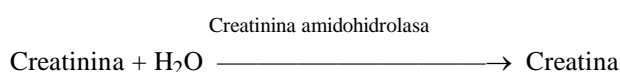
los casos donde la concentración del interferente es baja, la prolongación del tiempo de reacción puede superar el efecto de la interferencia. Para el plasma que va a ser almacenado por largos períodos de tiempo, la adición de 1 gramo de azida de sodio por litro, o la congelación de la muestra puede reducir la probabilidad de interferencia bacteriana.

Varias modificaciones se han realizado a la reacción de Jaffé original para aumentar la especificidad del ensayo. El uso de una muestra libre de proteínas en vez de suero mostró aumentar mucho la especificidad. También el agregado al filtrado de una arcilla de silicato de aluminio poroso (tierra de fuller, reactivo de Lloyd), para absorber la creatinina presente en el filtrado, libre de proteínas, además eliminó la mayoría de los potenciales interferentes (Tabla 26-4, método 2). La creatinina es reabsorbida por estos compuestos con aproximadamente un 92% de eficiencia y luego de la centrifugación y decantación del sobrenadante conteniendo los interferentes, uno puede agregar el picrato alcalino directamente a la bolita de creatinina absorbida. La mayoría de los potenciales interferentes no son adsorbidos. Sin embargo, el piruvato en exceso de 0.9 mmol/L y el 2-oxoglutarato en exceso de 0.5 mmol/L son adsorbidos y pueden de esa forma causar interferencia.^{ref(594)} El uso de métodos de adsorción para la medida de creatinina son infrecuentemente usados debido a su naturaleza laboriosa.

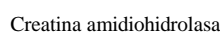
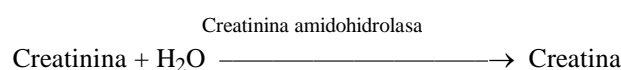
Métodos alternativos ahora usados en la práctica clínica incluyen métodos de picrato alcalino cinéticos y métodos enzimáticos de creatinina. El método cinético para la determinación de creatinina (Tabla 26-4, método 3) hace uso de la velocidad diferencial de desarrollo de color para cromógenos no creatinina versus creatinina. Aunque el método cinético reduce significativamente la interferencia causada por la mayoría de los cromógenos no creatinina, los compuestos como la bilirrubina aún interfieren y pueden sustancialmente reducir la medida de la concentración de creatinina.^{ref(595)}

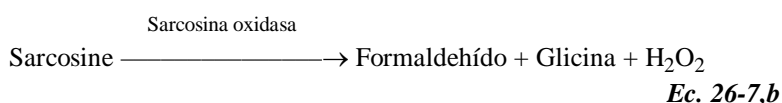
Se han desarrollado métodos enzimáticos para la medida de creatinina. Creatinina amidohidrolasa (E.C.3.5.3.10), también conocida como “creatinasa”, o “creatinina hidrolasa”, es comúnmente usada en los métodos enzimáticos para creatinina. Esta enzima es usada para convertir la creatinina en creatina, acoplada a una reacción indicadora (Tabla 26-4, método 4). Diferentes tipos de reacciones indicadoras han sido desarrolladas como se describe abajo:

I.



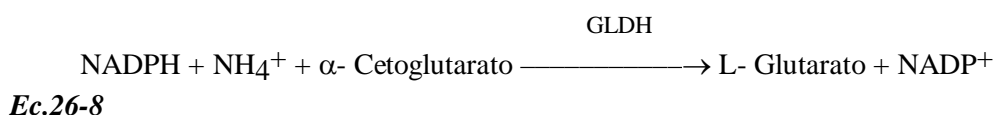
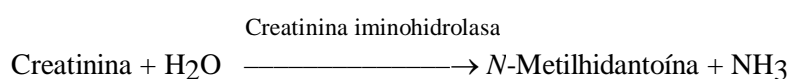
II.





La reacción indicadora descrita arriba en la reacción I permite el monitoreo continuo de la desaparición de NADH a 340 nm.⁴¹ En la reacción II, el peróxido de hidrógeno puede ser cuantificado por su reacción con un indicador de color apropiado.^{ref(596)}

Otro sistema enzimático menos frecuentemente usado para la cuantificación de creatinina es la creatinina deaminasa (E.C. 3.5.4.21), también conocido como “creatinina iminohidrolasa” (Tabla 26-4, método 5).



Con este método, el amoníaco puede ser cuantificado directamente por monitoreo de la reacción de NADPH con α -Cetoglutarato en la presencia de glutamato deshidrogenasa^{ref(597)} o por el uso de un electrodo de amoníaco.^{ref(598)} La mezcla de reacción debe estar libre de productores de amoníaco y materiales consumidores de amoníaco. Además, se debe realizar una corrección para el amoníaco endógeno.

Ha sido propuesto como método de referencia, la separación y cuantificación de creatinina usando cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) (Tabla 26-4, método 6), y se han informado muchas aplicaciones del HPLC.^{refs(599)} Las medidas de creatinina por HPLC se han encontrado ser exactas, y específicas.

Muestra.

Las muestras aceptables para el análisis son suero, plasma, y orina. No se ha notado diferencia en las concentraciones de creatinina entre el suero y el plasma. La orina debe ser diluida para una concentración final de creatinina de aproximadamente 300 a 600 (mol/L (34 a 68 mg/L); generalmente acompaña esto una dilución de 1:100. Los conservadores y anticoagulantes comunes (fluoruro y heparina) no causan interferencia, aunque la heparina, la cual puede estar formulada como sal de amonio, debe ser evitada en los métodos enzimáticos que miden la producción de amoníaco. Este tipo de ensayo enzimático también requiere una puntual remoción del suero de los glóbulos rojos y el análisis rápido para minimizar la producción de amoníaco in vitro; estas dos precauciones son necesarias debido a la imprecisión que resulta de un elevado blanco de amoníaco. Si van a ser analizados por la reacción de Jaffé, las muestras son estables por lo menos 7 días a 4°C.

Rangos de referencia (Tabla 26-5).

El nivel individual de creatinina sérica es dependiente de dos factores: la velocidad de



producción de creatinina y la velocidad de excreción de creatinina. Como la fuente de creatinina sérica es la creatina del músculo y fosfato de creatina, una mayor cantidad de masa muscular da como resultado un incremento en la creatinina sérica. El segundo y mucho mas significativo determinante de los niveles de creatinina sérica es la velocidad de excreción renal. Sin embargo, como una medida de la función renal, sin embargo, la determinación de la depuración de creatinina es más sensible que el nivel de creatinina sérica. Los recién nacidos y los niños tienen menores valores de depuración, y la depuración gradualmente aumenta en los adultos en la iniciación de la pubertad. Los valores de depuración de creatinina son relativamente constantes desde la pubertad a la edad media, generalmente disminuyendo desde la década de los cincuenta. Las determinaciones urinarias de rendimiento de creatinina son de valor, solamente con las determinaciones de depuración de creatinina o como una verificación de la completa recolección de las 24 horas. La excreción urinaria es directamente proporcional a la masa muscular; aproximadamente 0.5 mmol de creatinina son excretados por kilogramo de masa muscular. La dieta, volumen urinario, y ejercicio tienen un pequeño efecto sobre los niveles séricos de creatinina. Las concentraciones urinarias de creatinina son ligeramente aumentadas por el ejercicio y están ligeramente disminuidas en individuos con un déficit dietario de proteínas.^{ref(600)}

Los rangos de referencia dados en la Tabla 26-5 fueron determinados con la modificación de tierra de fuller sobre la reacción de Jaffé. Un método menos específico puede esperarse que resulte en niveles séricos ligeramente aumentados pero podría tener poco efecto sobre los niveles urinarios. Debido a este efecto no uniforme, un método menos específico podría resultar en un valor de depuración de creatinina calculado menor.

Urea

Steven C. Kazmierczak

Principios del análisis y uso corriente.

Los resultados de las medidas de urea sanguínea fueron originalmente informadas en términos de cantidades de nitrógeno liberado, con la concentración de urea siendo expresada como miligramos de nitrógeno ureico sanguíneo (BUN) por volumen (generalmente en decilitros). Esta terminología aún continúa a pesar del hecho que el suero y el plasma, no la sangre entera, son las muestras preferidas para el análisis, y la urea es medida directamente. Los valores de BUN pueden ser convertidos a concentraciones de urea como se indica a continuación:

1. Peso atómico de nitrógeno = 14.0 g/mol; Peso molecular de la urea = 60.1 g/mol.
2. Una molécula de urea contiene dos átomos de nitrógeno
3. El nitrógeno ureico (urea-N) constituye el 46.6% del peso de la urea (28.0 dividido por 60.1)
4. Por lo tanto
 $100 \text{ mg/L de BUN dividido por } 0.466 = 214.6 \text{ mg/L de urea}$
o
 $\text{mg de urea-N /L} \times 2.146 = \text{mg de urea/L}$



$$\text{mg de urea-N/L} \times 0.036 = \text{mmol de urea/L}$$

Las medidas de urea pueden ser realizadas por el uso de métodos *indirectos* por medio de los cuales la urea es hidrolizada por la enzima ureasa para formar amoníaco, el cual puede luego ser cuantificado; o *directamente* por reacción de la urea con compuestos para formar un producto cromogénico. Los métodos históricos para las determinaciones de urea estaban basados en la cuantificación química de amoníaco liberado desde la urea luego de un calentamiento a 125° C o por rompimiento enzimático de la urea por la ureasa. Estos métodos son hoy raramente usados; en la segunda edición de este libro puede encontrarse información adicional.

El método más común en uso hoy para la determinación de concentraciones de urea esta basado en la medida enzimática del NH₃ formado por la acción de la ureasa sobre la urea. Para medir el NH₃ formado se usa una reacción indicadora, empleando glutamato deshidrogenasa (GLDH) para oxidar al NADH a NAD⁺ (Tabla 26-6, método 1).^{ref(601)} Las enzimas endógenas, como la GLDH, que puede estar presente en el suero de algunos pacientes pueden interferir con este ensayo.^{ref(602)} Además, el amoníaco, que puede estar presente en el reactivo o en la muestra a ser analizada (como la orina) puede interferir con el ensayo. Esta interferencia puede ser eliminada si la reacción se realiza usando un modo de análisis cinético. Cuando se usa un modo cinético de análisis, el amoníaco endógeno es rápidamente consumido durante los segundos iniciales de la reacción, y los cambios subsiguientes en la absorbancia son esencialmente causados por el amoníaco generado por la reacción de la ureasa con la urea. También, si la reacción es corrida en el modo cinético con grandes diluciones de la muestra, no se ven interferencias significativas por la bilirubina, hemoglobina, o lipemia.

Un método muy común para analizar urea emplea la reacción entre NH₃ (producido por la acción de la ureasa) y un indicador de pH coloreado para producir cambio de color (Tabla 26-6, método 2).^{ref(603)} Este enfoque se utiliza con la tecnología de reactivo seco, o película-delgada^{ref(604)} o tiras reactivas.^{ref(605)} La ureasa inmovilizada en una capa esparcida inicial reacciona con la urea para producir NH₄⁺. Bajo condiciones alcalinas, el NH₃ pasa a través de una capa semipermeable y reacciona con un indicador de pH coloreado. El cambio de color que ocurre es monitoreado por reflectancia fotométrica. Estos métodos muestran excelente exactitud, y allí parecen ser pocas las interferencias importantes con las bioquímicas encontradas comúnmente.

Otro ensayo común para la cuantificación de urea está basado sobre el cambio en la conductividad de una muestra que ocurre luego de la acción de la ureasa sobre la urea (Tabla 26-6, método 3).^{ref(606)} El CO₂ y el amoníaco que son producidos por la ureasa reaccionan formando carbonato de amonio ([NH₄]₂ CO₃), el cual aumenta la conductividad de la mezcla de reacción. Cuando se ejecuta un modo de análisis cinético para corregir la conductividad endógena de la muestra, ambas muestras, suero y orina pueden medirse usando este método.

Las determinaciones de urea pueden ser realizadas usando un electrodo ion-selectivo de amoníaco para monitorear la reacción de ureasa (Tabla 26-6, método 4). Aunque esta tecnología ha estado disponible por algún tiempo, no ha sido ampliamente usada en el laboratorio clínico. Este método emplea ureasa, unida a una membrana adherida al electrodo, para convertir la urea en amoníaco y CO₂; un electrodo de amonio es usado para detectar el



amoníaco formado por la reacción. El uso de esta tecnología se ha encontrado que es muy específico para la urea, y los resultados obtenidos para la urea por este método están estrechamente de acuerdo con los obtenidos usando otros métodos.[ref\(607\)](#)

Otro método infrecuentemente usado para la urea incluye la reacción de *o*-ftalaldehído con aminas primarias, como la urea (Tabla 26-6, método 5), y la reacción de la diacetil monoxima (Tabla 26-6, método 6) (ver la segunda edición). La isoindolina producto de la reacción de *o*-ftalaldehído se acopla con un complejo quinolina para formar un cromógeno que es monitoreado a 510 nm. Otras aminas primarias pueden interferir en este ensayo. La diacetil monoxima no reacciona directamente con la urea pues es primero hidrolizada para formar diacetilo e hidroxilamina. El diacetilo condensa con la urea en una solución ácida para dar un producto diazina amarillo. Una desventaja de este método es la fotosensibilidad y el rápido desvanecimiento de los productos coloreados.

Muestra.

Pueden ser usados suero y plasma heparinizado para los métodos de urea que se han descrito. El fluoruro inhibirá la reacción de ureasa, por lo tanto los métodos que emplean ureasa no pueden usar sueros conservados con fluoruro. La heparina de amonio también no puede ser usada como un anticoagulante para los métodos basados en ureasa. La urea en la orina puede ser analizada luego de realizar una dilución de la muestra (típicamente entre 1:20 y 1:50). Debido a la susceptibilidad de la urea a la degradación bacteriana, las muestras de suero y orina deben mantenerse entre 4° y 8° C hasta su análisis. Las muestras de orina pueden también ser conservadas por mantención del pH menor que 4.

Rangos de referencia.

El rango de referencia para el BUN sérico varía dependiendo del método usado para su medida (Tabla 26-7). Los niños pequeños tienen valores séricos de urea ligeramente inferiores a los que tienen los adultos y los niños más grandes. Las variaciones individuales en las concentraciones del BUN también dependen de los hábitos dietarios de la persona: aquellos que consumen menos proteínas tendrán concentraciones séricas de urea menores. Similarmente, la excreción urinaria de urea varía con la dieta.

Acido úrico

Arnold L. Shultz

Principios de análisis y uso corriente.

Los primeros métodos para el ácido úrico utilizaron la posibilidad de una solución alcalina de ácido úrico de reducir ácido fosfotúngstico a azul de tungsteno.[ref\(608\)](#) El método original usaba la precipitación proteica y separación del ácido úrico del filtrado antes de reaccionar con el ácido fosfotúngstico.(Tabla 26-8, método 1). Pocos laboratorios miden actualmente el ácido úrico usando el método del fosfotungstato. Los inconvenientes de este método incluyen su falta de especificidad para el ácido úrico por las interferencias de compuestos que pueden también reducir el ácido fosfotúngstico.

El uso de la enzima uricasa ha llevado al desarrollo de ensayos más específicos para el ácido úrico (Tabla 26-8, método 2). La oxidación del ácido úrico a alantoína y peróxido de



hidrogeno por la enzima uricasa permitió cuantificar al ácido úrico por una variedad de técnicas. Un método para cuantificar ácido úrico hace uso del espectro de absorción diferente de la alantoína y el ácido úrico. (Tabla 26-8, método 2a) La alantoína a diferencia del ácido úrico, no tiene un máximo de absorción en la región de 290-293 nm del espectro ultravioleta. Han sido empleadas para la determinación cuantitativa de ácido úrico en suero, plasma y orina las mediciones de absorción en estas longitudes de onda antes de la incubación del ácido úrico con uricasa y después de ella.[ref\(609\)](#)

Alternativamente el peróxido de hidrógeno que se produce luego de la oxidación del ácido úrico por la uricasa puede ser cuantificado por la medida del producto cromogénico que se forma cuando un colorante, tal como *o*-dianisidina es oxidado por el peróxido de hidrógeno.(Tabla 26-8, método 2b).[ref\(610\)](#) Otros compuestos pueden también reaccionar con el peróxido de hidrógeno para producir cromóforos coloreados incluido a la 3-metil 2-benzotiazolinona y *N,N*-dimetilanilina, produciendo un colorante azul indamina[ref\(611\)](#) y ácido 3,5-dicloro 2-hidroxibencenosulfónico y 4-aminofenazona formando un colorante rojo de quinonimina.[ref\(612\)](#)

El peróxido de hidrógeno formado en la reacción de la uricasa ha sido monitoreado por la oxidación del etanol a acetaldehído. Esta reacción se acopla a la oxidación enzimática del acetaldehído y NADH a acetato y NAD⁺ por la aldehído deshidrogenasa,el cambio de absorbancia a 340 nm está relacionado a la concentración de ácido úrico.[ref\(613\)](#)

La oxidación del ácido úrico por la uricasa puede monitorearse cuando la velocidad de consumo de oxígeno es seguida durante la reacción (Tabla 26-8, método 2c).[ref\(614\)](#) La velocidad de consumo de oxígeno es proporcional a la concentración de ácido úrico y puede ser medida por un sensor polarográfico para oxígeno.

Se ha desarrollado la cuantificación de ácido úrico en suero[ref\(615\)](#) y orina[ref\(616\)](#) por cromatografía líquida de alta precisión (HPLC)(Tabla 26-8, método 3). Aunque HPLC no es usado rutinariamente, la sensibilidad y especificidad por HPLC para la determinación de ácido úrico ha llevado a que este método haya comenzado a ser propuesto como el de elección para el ácido úrico.[ref\(617\)](#)

Muestra.

Para la determinación de ácido úrico se puede usar suero o plasma. Debe evitarse el EDTA y el fluoruro ya que interfieren en forma positiva con métodos basados en la uricasa. El ácido úrico es estable a 2 a 6 ° C por 3 a 5 días y por lo menos 6 meses a -20° C.

La determinación de la concentración de ácido úrico en orina puede ser realizada siempre que la muestra esté apropiadamente conservada. Para prevenir la precipitación de sales de ácido úrico; se agrega 10 ml de hidróxido de sodio (500g/l) en el frasco de recolección antes de recoger la muestra de 24 horas. El ácido úrico en orina debidamente preservado es estable por aproximadamente 3 días a temperatura ambiente siempre que no exista desarrollo bacteriano que lo degrade.

Intervalo de referencia.

Suero o plasma

36 a 77 mg/L (214 a 458 (m/L) para hombres.

28 a 68 mg/L (149 a 405 (m/L) para mujeres.



Orina

250 a 750 mg (1.49mmol a 4.46mmol)/24 h. Para una dieta promedio.

Hasta 450mg (2.68 mmol)/24h para una dieta pobre en purina.

Hasta 1g (5.95mmol)/24h para una dieta rica en purina.

Proteínas urinarias totales

Steven C. Kazmierczak

Principio del análisis.

Las proteínas urinarias totales se miden por turbidimetría colorimétrica, y por fijación de colorantes. En turbidimetría un precipitante de proteínas se agrega a la muestra, y la proteína desnaturalizada precipitada en forma de suspensión fina es cuantificada turbidimétricamente (Tabla 26-9, método 1). Los reactivos usados como precipitantes incluyen ácido tricloroacético (TCA), ácido sulfosalicílico (SSA), y cloruro de bencetonio (BZC) en álcali; BZC es el más comúnmente usado como precipitante. La turbidimetría varía apreciablemente con la naturaleza química del precipitante. Por ejemplo, SSA produce con la albúmina cuatro veces mayor turbidez que la que hace con la γ -globulina y también precipita una cantidad significativa de polipéptidos en la orina.^{ref(618)} Los métodos que usan SSA como agente precipitante, adolecen en general de poca precisión, diferentes respuestas a diferentes proteínas, y carecen de concordancia con otros métodos para proteínas. La turbidez que se produce por TCA no se afecta por cambios en la relación albúmina/globulina cuando la guardada a temperatura se mantiene entre 20°C a 25°C. Arriba de 25°C sin embargo se produce una mayor turbidez con la albúmina que con la globulina.^{ref(619)} Otra falla asociada con el TCA es que concentración de proteínas urinarias totales no se determinan cuando la α_1 -glicoproteína ácida está en concentraciones elevadas; hallazgo común en pacientes con una reacción de fase aguda.^{ref(620)} Algunas drogas han presentado interferencias con el procedimiento de TCA.^{refs(621)}

El agente desnaturalizante de proteínas BZC es el más sensible de los métodos de turbidimetría. Sin embargo aún este procedimiento no está exento de fallas. La γ -globulina produce de 11% a 31% menos turbidez que la albúmina, dependiendo de la concentración de proteínas totales de la muestra.^{ref(622)} Además la fluoresceína, agente farmacológico frecuentemente usado para la evaluación de la retinopatía diabética y vasculopatías retinal, interfiere con este método.^{ref(623)}

Las técnicas de medida de las proteínas por unión a colorantes están basadas en el cambio de la absorción máxima del colorante cuando se une a las proteínas. El cambio en el máximo de absorbancia del colorante permite medir el color resultante en presencia de exceso de colorante. Un método frecuentemente utilizado de unión a colorante es el de Azul Brillante de Coomassie (G-250) (CBB, Tabla 26-9, método 2). Este método es sensible y preciso, la unión es completa a los 2 minutos; y el color es estable por una hora. Lamentablemente, este colorante produce más color por gramo de proteínas con la albúmina que con la globulina.^{ref(624)} El timol y el salicilato usado frecuentemente como conservador interfiere con el método de CBB,^{ref(625)} han encontrado que también interfieren tobutamida y urea en concentraciones de 2 a 4 g/L, respectivamente, el reactivo Azul Coomassie, puede adherirse a las paredes de las cubetas, limitando así su aplicación.



Otro método de conjugación de colorantes usado es el de N molibdato de pirogalol (Tabla 26-9, método 3). [ref\(626\)](#) Este procedimiento mide el color azul que se forma cuando se une el de N molibdato de pirogalol con grupos amino básicos. El color azul resultante se mide fotométricamente a 600nm. Como otros procedimientos de unión a colorantes, la sensibilidad depende del tipo de proteínas que va a ser medida. Sin embargo la adición de surfactantes tales como el dodecil sulfato de sodio (25 mg/L) a la mezcla de reactivos iguala el color que se produce con la albúmina y la γ -globulina. [ref\(627\)](#) A igual que el Azul de Coomassie la falla potencial del método puede estar en la unión del producto azul formado con las paredes de las cubetas. Causando una deriva en la en la línea de base de la absorbancia leída. La automatización de estos métodos pueden posiblemente limitarse al uso de instrumentos con el uso de una solo cubeta. [ref\(628\)](#)

La reacción del reactivo de biuret (iones Cu^{++}) con las uniones peptídicas de las proteínas es aún usado por algunos laboratorios para la cuantificación de proteínas en orina, (Tabla 26-9, método 4). Dado que el biuret es relativamente no sensible, las proteínas deben concentrarse antes del análisis. La concentración se acompaña de la precipitación de proteínas con TCA o orina con ácido fosfotungstico-etano hidrociorado. La proteína precipitada se separa por centrifugación y se disuelve en el reactivo de biuret. La reacción de biuret sufre interferencias con algunos metabólicos coloreados (tales como bilirrubina) y ion amonio. [ref\(629\)](#)

Una técnica semicuantitativa para estimar la concentración urinaria de proteínas usa un método que une un indicador de pH conjugado a un colorante. (Tabla 26-9, método 5). Esta técnica usualmente incorporada a tiras emplea un un indicador de pH coloreado, tal como azul de tetrabromo, embebido en la almohadilla. Cuando la proteína se une al colorante hay un cambio en el entorno del colorante, resultando en un cambio en el color del colorante. Esta metodología es más sensible para la albúmina y relativamente insensible para la γ -globulina. La presencia de grandes cantidades de bilirrubina u otros compuestos altamente coloreados en orina pueden modificar el color de la almohadilla del reactivo y dificultar la interpretación de la tira reactiva. Los hallazgos de falsos positivos no son infrecuentes en este método, por lo tanto el reactivo en tiras es más bien usado como método de "screening". Los resultados positivos por este método debe ser confirmados por otra técnica.

Muestra.

Se prefiere una muestra de orina de 24 orina o 12 horas sin conservadores. Sin embargo debido a los inconvenientes y dificultades de una recolección adecuada y completa de muestras de orina de 12- 24- horas, la determinación de la relación de la concentración proteína/creatinina en una muestra al azar (no regulada en tiempo) se puede usar para estimar más exactamente la excreción proteica en orina. [refs\(630\)](#) Si la muestra no se puede analizar en las 48 horas de su recolección, debe mezclarse bien y una alícuota debe ser congelada. Muestras congeladas pueden ser conservadas por lo menos un año.

Rangos de referencia.

En personas sanas los rangos de excreción de proteína urinaria son aproximadamente de 40 mg/día, el límite superior de excreción proteica debe ser menor de 150 mg/día. [refs\(631\)](#) De la proteínas normalmente excretada, un tercio es albúmina y dos tercios son globulinas.

En orina recogidas al azar orina no en tiempos fijos de adultos sanos, el rango de



excreción proteica es <150 mg/día, la relación es <100 mg/día de proteína por gramo de creatinina. La relación de concentración proteína/creatinina >2000 mg/g es comparable con un rango de excreción urinaria proteica $>3-4$ g/día. [ref\(632\)](#)

Referencias

1. Kokko JP: Renal concentrating and diluting mechanism, *Hosp Pract* 14:110-116, 1979.
2. Schrier RW: *Renal and electrolyte disorders*, ed 3, Boston, 1986, Little, Brown & Co.
3. Peart WS: Renin-angiotensin system, *N Engl J Med* 292:302-306, 1975.
4. Rose BD: *Pathophysiology of renal disease*, New York, 1981, McGraw-Hill, pp 579-585.
5. MacKnight ADC: Epithelial transport of potassium, *Kidney Int* 11:391-414, 1977.
6. Suki WN: Disposition and regulation of body potassium: an overview, *Am J Med Sci* 272:31-41, 1976.
7. Giebisch G, Malnic G, Berliner RW: Renal transport and control of potassium excretion. In 8. Brenner BM, Rector FC, editors: *The kidney*, Philadelphia, 1991, Saunders.
8. Massry SG, Friedler RM, Coburn JW: Excretion of phosphate and calcium, *Arch Intern Med* 131:828-859, 1973.
9. Agus ZS, Gardner LB, Beck LH, Goldberg M: Effects of parathyroid hormone on renal tubular reabsorption of calcium, sodium, and phosphate, *Am J Physiol* 224:1143-1148, 1973.
10. Slatopolsky E, Robson AM, Elkan I, Bricker NS: Control of phosphate excretion in uremic man, *J Clin Invest* 47:1865-1874, 1968.
11. Contiguglia SR, Alfrey AC, Miller N, Butkus D: Total-body magnesium excess in chronic renal failure, *Lancet* 1:1300-1302, 1972.
12. Richardson RMA, Goldstein MB, Stinebaugh BJ, Halperin ML: Influence of diet and metabolism on urinary acid secretion in the rat and the rabbit, *J Lab Clin Med* 94:510-518, 1979.
13. Flessner MF, Knepper MA: Renal acid-base transport. In Schrier RW, Gottchalk CW, editors: *Diseases of the kidney*, Boston, 1993, Little, Brown & Co.
14. First MR: *Chronic renal failure*, Garden City, N.Y., 1982, Medical Examining Publishing Co, pp 1-5, 15-18.
15. Walser M: Urea metabolism in chronic renal failure, *J Clin Invest* 53:1385-1392, 1974.
16. Perrone RD, Madias NE, Levey AS: Serum creatinine as an index of renal function: new insights into old concepts, *Clin Chem* 38:1933-1953, 1992.
17. Stein JH: Hormones and the kidney, *Hosp Pract* 14:91-105, 1979.
18. Haussler MR, McCain TA: Basic and clinical concepts related to vitamin D metabolism and action, *N Engl J Med* 297:974-983, 1041-1050, 1977.
19. Eschbach JW, Adamson JW, Cook JB: Disorders of red blood cell production in uremia, *Arch Intern Med* 26:812-815, 1970.
20. Pesce AJ, First MR: *Proteinuria: an integrated review*, New York, 1979, Marcel Dekker, pp 80-99, 100-143.
21. Perlmann GE, Tamm I, Horsfall FL: An electrophoretic examination of a urinary mucoprotein which reacts with various viruses, *J Exp Med* 95:99-104, 1952.
22. Coe FL: Clinical and laboratory assessment of the patient with renal disease. In Brenner BM, Rector FC, editors: *The kidney*, vol 1, Philadelphia, 1986, Saunders.
23. Madias NE, Perrone RD: Acid-base disorders in association with renal disease. In Schrier RW, Gottschalk CW, editors: *Disease of the kidney*, Boston, 1993, Little, Brown & Co.
24. First MR, Pollak VE: Renal insufficiency in the diabetic patient with heart disease. In Scott RC, editor: *Clinical cardiology and diabetes*, vol 3, part 2, Mount Kisco, N.Y., 1981, Futura Publishing.



25. Viberti GC, Keen H: The patterns of proteinuria in diabetes mellitus: relevance to pathogenesis and prevention of diabetic nephropathy, *Diabetes* 33:686-692, 1984.
26. Wiegmann TB, Chonko AM, McDougall ML, Moore WV: The role of disease duration and hypertension in albumin excretion of type I diabetes mellitus, *J Am Soc Nephrol* 2:1587-1592, 1992.
27. Mogensen CE, Christensen CK: Predicting diabetic nephropathy in insulin-dependent patients, *N Engl J Med* 311:356-360, 1984.
28. Mathiesen ER, Ronn B, Jensen T, et al: Relationship between blood pressure and urinary albumin excretion in development of microalbuminuria, *Diabetes* 39:245-249, 1990.
29. Ware F: Renal function tests: a guide to interpretation, *Hosp Med* 9:77-92, 1981.
30. Cockcroft DW, Gault MH: Prediction of creatinine clearance from serum creatinine, *Nephron* 16:31-41, 1976.
31. Harrington JT: Evaluation of serum and urinary electrolytes, *Hosp Pract* 17:28-39, 1982.
32. Oken DE: On the differential diagnosis of acute renal failure, *Am J Med* 71:916-920, 1981.
33. Jaffe M. Ueber den Niederschlag welchen Pikrinsäure in normalen Harn erzeugt und über eine neue Reaction des Kreatinins, *Z Physiol Chem* 10:391-400, 1886.
34. Folin O: On the determination of creatinine and creatine in blood, milk and tissues, *J Biol Chem* 17:475-481, 1914.
35. Perrone RD, Madias NE, Levey AS: Serum creatinine as an index of renal function: new insights into old concepts, *Clin Chem* 38:1933-1953, 1992.
36. Rajs G, Mayer M: Oxidation markedly reduces bilirubin interference in the Jaffe creatinine assay, *Clin Chem* 38:2411-2413, 1992.
37. Dilena BA: Bacterial interference with measurement of creatinine in stored plasma, *Clin Chem* 34:1007-1008, 1988.
38. Haeckel R: Assay of creatinine in serum with use of fuller's earth to remove interferents, *Clin Chem* 27:179-183, 1981.
39. Weber JA, van Zanten AP: Interferences in current methods for measurement of creatinine, *Clin Chem* 37:965-700, 1991.
40. Swain RR, Briggs SL: Positive interference with the Jaffe reaction by cephalosporin antibiotics, *Clin Chem* 23:1340-1342, 1977.
41. Moss GA, Bondar RJL, Buzzelli DM: Kinetic enzymatic method for determining serum creatinine, *Clin Chem* 21:1422-1426, 1975.
42. Kodak Ektachem clinical chemistry slides (CREA), test methodology sheet, pub no MP2-49 (revision 1992), Rochester, N.Y., 1992, Eastman Kodak Co.
43. Tanganelli E, Prencipe L, Bassi D, et al: Enzymic assay of creatinine in serum and urine with creatinine iminohydrolase and glutamate dehydrogenase, *Clin Chem* 28:1461-1464, 1982.
44. Thompson H, Rechnitz GA: Ion electrode-based enzymatic analysis of creatinine, *Anal Chem* 46:246-249, 1974.
45. Zhiri A, Houot O, Wellman-Bednawska M, Siest G: Simultaneous determination of uric acid and creatinine in plasma by reversed-phase liquid chromatography, *Clin Chem* 31:109-112, 1985.
46. Rosano TG, Ambrose RT, Wu AHB, et al: Candidate reference method for determining creatinine in serum: method development and interlaboratory validation, *Clin Chem* 36:1951-1955, 1990.
47. Delanghe J, Slypere JPD, Buyzere MD, et al: Normal reference values for creatine, creatinine, and carnitine are lower in vegetarians, *Clin Chem* 35:1802-1803, 1989.
48. Tiffany TO, Jansen JM, Burtis CA, et al: Enzymatic kinetic rate and endpoint analysis of substrate, by use of a GeMSAEC fast analyzer, *Clin Chem* 18:829-840, 1972.
49. Harrison SP: Interference in coupled-enzyme assay of urea nitrogen by excess endogenous enzyme, *Clin Chem* 39:911, 1993.
50. Ohkubo A, Kamei S, Yamanaka M, et al: Multilayer-film analysis for urea nitrogen in blood, serum, or plasma, *Clin Chem* 30:1222-1225, 1984.

51. Hammond BR, Lester E: Evaluation of a reflectance photometric method for determination of urea in blood, plasma, or serum, *Clin Chem* 30:596-597, 1984.
52. Chin WT, Kroontje W: Conductivity method for determination of urea, *Anal Chem* 33:1757-1760, 1961.
53. Gourmelin Y, Gouget B, Truchaud A: Electrode measurement of glucose and urea in undiluted samples, *Clin Chem* 36:1646-1649, 1990.
54. Folin O: An improved method for the determination of uric acid in blood, *J Biol Chem* 86:179-187, 1930.
55. Feichtmeier TV, Wrenn HT: Direct determination of uric acid using uricase, *Am J Clin Pathol* 25:833-839, 1955.
56. Marymount JH, London M: Analyses performed with heat-coagulated blood and serum. VI. Direct determination of urates by means of o-dianisidine oxidation, *Am J Clin Pathol* 42:630-633, 1964.
57. Gochman N, Schmitz JM: Automated determination of uric acid, with use of a uricase-peroxidase system, *Clin Chem* 17:1154-1159, 1971.
58. Fossati P, Prencipe L, Berti G: Use of 3,5-dichloro-2-hydroxy-benzenesulfonic acid/4-aminophenazone chromogenic system in direct enzymatic assay of uric acid in serum and urine, *Clin Chem* 26:227-231, 1980.
59. Haeckel R: The use of aldehyde dehydrogenase to determine H₂O₂-producing reactions. I. The determination of the uric acid concentration, *J Clin Chem Clin Biochem* 14:101-107, 1976.
60. Bell R, Ray RA: A rate-sensing approach to the measurement of uric acid in serum and urine, *Clin Chem* 17:644, 1971.
61. Pachla LA, Kissinger PT: Measurement of serum uric acid by liquid chromatography, *Clin Chem* 25:1847-1852, 1979.
62. Hausen A, Fuchs D, Konig K, Wachter H: Quantitation of urinary uric acid by reversed-phase liquid chromatography, *Clin Chem* 27:1455-1456, 1981.
63. Hohnadel DC, Koller A: Urine protein, total. In Pesce AJ, Kaplan LA, editors: *Methods in clinical chemistry*, St. Louis, 1987, Mosby.
64. Beilby JP, O'Leary BA: α 1-Acid glycoprotein decreases recovery of total protein in urine when trichloroacetic acid is used to precipitate the proteins, *Clin Chem* 36:565-567, 1990.
65. Lievens MM, Celis PJ: Drug interference in turbidimetry and colorimetry of proteins in urine, *Clin Chem* 28:2328, 1982 (Letter).
66. Koumantakis G, Wyndham L: Fluorescein interference with urinary creatinine and protein measurements, *Clin Chem* 37:1799, 1991.
67. Fujita Y, Mori I, Kitano S: Color reaction between pyrogallol red-molybdenum (IV) complex and protein, *Bunseki Kagaku* 32:E379-386, 1983.
68. Orsonneau JL, Douet P, Massoubre C, et al: An improved pyrogallol red-molybdate method for determining total urinary protein, *Clin Chem* 35:2233-2236, 1989.
69. van Ingen HE: Automated analysis for urinary protein by pyrogallol red-molybdate method, *Clin Chem* 36:702, 1990.
70. Waller KV, Ward KM, Mahan JD, Wismatt DK: Current concepts in proteinuria. *Clin Chem* 35:755-765, 1989.
71. Lemann J Jr, Doumas BT: Proteinuria in health and disease assessed by measuring the urinary protein/creatinine ratio, *Clin Chem* 33:297-299, 1987.
72. Ginsberg JM, Chang BS, Matarese RA, Garella S: Use of single voided urine samples to estimate quantitative proteinuria, *N Engl J Med* 309:1543-1546, 1983.
73. Cohen EP, Lemann J Jr: The role of the laboratory in evaluation of kidney function, *Clin Chem* 37:785-796, 1991.

Tablas

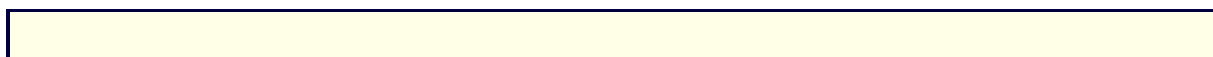
Tabla 26-1. Filtración, reabsorción, y excreción por los riñones.

Componente	Cantidad filtrada/día	Cantidad excretada/día	Porcentaje reabsorbido
Agua	180 L	1.5 L	99.2
Sodio	24,000 mEq	100 mEq	99.6
Cloruro	20,000 mEq	100 mEq	99.5
Bicarbonato	5,000 mEq	2 mEq	99.9
Potasio	700 mEq	50 mEq	99.2
Glucosa	180 g	0	100
Albúmina	360 mg	18 mg	95.0

Tabla 26-2. Asociación de condiciones patológicas que afectan el riñón y anomalías clínicas y bioquímicas.

Hipertensión		Edema	
AGN:	++	AGN:	+
NS:	+	NS:	++
TD:	0	TD:	0
UTI:	0	UTI:	0
HT:	++	HT:	0
RTV:	±	RTV:	+
DM:	±	DM:	+
UTO:	0	UTO:	0
RC:	0	RC:	0
ARF:	+	ARF:	+
CRF:	+	CRF:	+
Oliguria o anuria		Poliuria	
AGN:	+	AGN:	0
NS:	±	NS:	0
TD:	0	TD:	+
UTI:	0	UTI:	0
HT:	0	HT:	0
RTV:	±	RTV:	0
DM:	0	DM:	+
UTO:	+	UTO:	0
RC:	0	RC:	0
ARF:	+	ARF:	0
CRF:	+	CRF:	0
Nocturia		Frecuencia	
AGN:	0	AGN:	0
NS:	±	NS:	0
TD:	+	TD:	0
UTI:	±	UTI:	+

HT:	0	HT:	0
RTV:	0	RTV:	0
DM:	+	DM:	0
UTO:	±	UTO:	±
RC:	0	RC:	±
ARF:	0	ARF:	0
CRF:	0	CRF:	0
Dolor renal		Anemia	
AGN:	0	AGN:	+
NS:	0	NS:	0
TD:	0	TD:	0
UTI:	+	UTI:	0
HT:	0	HT:	0
RTV:	+	RTV:	0
DM:	0	DM:	0
UTO:	+	UTO:	0
RC:	+	RC:	0
ARF:	0	ARF:	0
CRF:	0	CRF:	++
↑Nitrógeno ureico sanguíneo		↑Creatinina sérica	
AGN:	+	AGN:	+
NS:	0	NS:	--
TD:	0	TD:	--
UTI:	0	UTI:	--
HT:	±	HT:	±
RTV:	±	RTV:	±
DM:	±	DM:	±
UTO:	±	UTO:	±
RC:	0	RC:	0
ARF:	+	ARF:	+
CRF:	+	CRF:	+
↓IFG		↑Potasio sérico	
AGN:	+	AGN:	±
NS:	0	NS:	±
TD:	0	TD:	0
UTI:	0	UTI:	0
HT:	±	HT:	0
RTV:	±	RTV:	0
DM:	±	DM:	0
UTO:	±	UTO:	0
RC:	0	RC:	0
ARF:	+	ARF:	+
CRF:	+	CRF:	+
↑Fósforo sérico		↓Calcio sérico	
AGN:	±	AGN:	0
NS:	0	NS:	+
TD:	0	TD:	0
UTI:	0	UTI:	0



HT:	0	HT:	0
RTV:	0	RTV:	0
DM:	0	DM:	0
UTO:	0	UTO:	0
RC:	0	RC:	0
ARF:	+	ARF:	+
CRF:	+	CRF:	+
↑Acido úrico sérico		Acidosis	
AGN:	0	AGN:	0
NS:	0	NS:	0
TD:	+	TD:	+
UTI:	0	UTI:	0
HT:	±	HT:	0
RTV:	0	RTV:	0
DM:	±	DM:	0
UTO:	0	UTO:	0
RC:	±	RC:	0
ARF:	+	ARF:	+
CRF:	+	CRF:	+
Proteinuria		Hematuria	
AGN:	+	AGN:	++
NS:	++++	NS:	+
TD:	+	TD:	±
UTI:	±	UTI:	+
HT:	±	HT:	0
RTV:	++	RTV:	+
DM:	+	DM:	0
UTO:	0	UTO:	0
RC:	0	RC:	++
ARF:	±	ARF:	+
CRF:	+	CRF:	±
Cilindros RBC		Piuria	
AGN:	+	AGN:	±
NS:	+	NS:	0
TD:	0	TD:	0
UTI:	0	UTI:	++
HT:	0	HT:	0
RTV:	0	RTV:	0
DM:	0	DM:	0
UTO:	0	UTO:	±
RC:	0	RC:	±
ARF:	±	ARF:	0
CRF:	0	CRF:	0
Cilindros WBC		Glucosuria	
AGN:	0	AGN:	0
NS:	0	NS:	0
TD:	0	TD:	+
UTI:	0	UTI:	0

HT:	+	HT:	0
RTV:	0	RTV:	0
DM:	0	DM:	++
UTO:	+	UTO:	0
RC:	+	RC:	0
ARF:	+	ARF:	0
CRF:	+	CRF:	0
<p><i>AGN</i>, Glomerulonefritis aguda; <i>ARF</i>, Insuficiencia renal aguda; <i>CRF</i>, Insuficiencia renal crónica; <i>DM</i>, Diabetes mellitus; <i>IFG</i>, Velocidad de filtración glomerular; <i>HT</i>, hipertensión; <i>NS</i>, Síndrome nefrótico; <i>RBC</i>, glóbulos rojos; <i>RC</i>, Cálculo renal; <i>RVT</i>, Trombosis venosa renal; <i>TD</i>, Enfermedad tubular; <i>UTI</i>, Infección del tracto urinario; <i>UTO</i>, Obstrucción del tracto urinario; <i>WBC</i>, glóbulos blancos. 0, Ausente; \pm, variable; +, presente.</p>			

Tabla 26-3. Hallazgos microscópicos característicos en la orina en la enfermedad renal.

Condición:	Normal
Proteína:	0-Trazas
Glóbulos rojos: (por campo alto poder)	0-3
Glóbulos blancos: (por campo de alto poder)	0-5
Bacteria:	0
Cilindros: (por campo de bajo poder)	Hialinos, ocasional
Condición:	Glomerulonefritis
Proteína:	1-2+
Glóbulos rojos: (por campo alto poder)	>20
Glóbulos blancos: (por campo de alto poder)	0-10
Bacteria:	0
Cilindros: (por campo de bajo poder)	Granular glóbulos rojos
Condición:	Síndrome nefrótico
Proteína:	4+
Glóbulos rojos: (por campo alto poder)	0-10
Glóbulos blancos: (por campo de alto poder)	0-5
Bacteria:	0
Cilindros: (por campo de bajo poder)	Cuerpos grasos oval, hialino
Condición:	Pielonefritis
Proteína:	0-1+
Glóbulos rojos:	0-10



(por campo alto poder)
Glóbulos blancos: >30
(por campo de alto poder)
Bacteria: ++
Cilindros: Granular glóbulos blancos
(por campo de bajo poder)

Tabla 26-4. Métodos para el análisis de creatinina.

Método	Tipo de análisis	Principio	Usos	Comentarios
1. Jaffé	Espectrofotométrico (520 nm) punto final, cuantitativo	Creatinina + Picrato OH → complejo de Janovski (rojo)	Suero, plasma orina diluida	Descrita por Jaffé, 1886
2. Jaffé/ tierra de Batán	Igual que 1. Creatinina aislada antes del análisis. Puede ser removida con buffer o reactivo picrato agregado directamente a la suspensión de creatinina adsorbida.	Como en (1)	Suero, plasma, orina diluida	Método de referencia alternativamente se puede usar intercambiadores de cationes como adsorbente
3. Jaffé, cinética automatizada	Espectrofotométrico, cuantitativo, análisis cinético durante la formación temprana del color	Como en (1)	Suero, plasma, orina diluida	Requiere equipos para medidas de absorbancia exactas y precisas, comúnmente usado
4. Creatinina amidohidrolasa	Hidrólisis enzimática a creatina, la cual reacciona en la reacción indicadora	Creatinina + H ₂ O Creatinina amidohidrolasa → → Creatina Creatina medida vía reacción indicadora	Suero	Comúnmente usada
5. Creatinina iminohidrolasa	Hidrólisis enzimática de creatinina con formación de amoníaco, el cual puede ser cuantificado espectrofotométricamente o electrométricamente	Creatinina Cret. iminohidrolasa → → N-metilhidantoína + NH ₃ . El NH ₃ medido por la reacción de GLDH, electrodo de amoníaco o colorimétricamente	Suero	Método enzimático menos común

6.Cromatografía de alta performance (HPLC)	Separación por intercambio catiónica o cromatografía de fase inversa de creatinina de otros compuestos	Creatinina cuantificada por método 1 o absorción a 200 nm	Suero, plasma específico, no orina	Usualmente útil para el análisis, posible método de referencia
GLDH, Glutamato deshidrogenasa.				

Tabla 26-5. Intervalos de referencia para Creatinina y depuración de Creatinina.*

Edad	Creatinina sérica mg/L (μmol/L)	Creatinina urinaria g/día (mmol/día)	Depuración de creatinina (mL/min)
>12 años	2.5-8.5 (22-75)	0.057 g (0.5 mmol/kg) de músculo	50-90
Hombres adultos	6.4-10.4 (57-92)	1.0-2.0 (8.8-17.7)	97-137
Mujeres adultas	5.7-9.2 (50-81)	0.8-1.8 (7.1-15.9)	88-128
*De Meites S, editor: Química clínica pediátrica, Washington, D.C., 1981, Asociación americana para la química clínica, pp 171-177; y de Newkirk RE, Rawnsley HM: <i>depuración de creatinina</i> , ASCP muestra de chequeo de química clínica n° CC-110, Chicago, 1978, Sociedad americana de patólogos clínicos.			

Tabla 26-6. Métodos para el análisis de urea.

Método:	1.Enzimático acoplado (ureasa glutamato deshidrogenasa [GLDH])
Tipo de análisis:	Cuantitativo, punto final, cinético, espectrofotométrico
Principio:	$\text{Urea} + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{Ureasa}} (\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ $\text{NH}_4^+ + \text{ácido } \alpha\text{-Cetoglutárico} + \text{NADH} \xrightarrow{\text{GLDH}} \text{ADP} + \text{H}^+ + \text{NAD}^+$



+ ácido Glutámico	
Usos:	Procedimiento más frecuentemente usado
Comentarios:	Muy específico, rápido
Método:	2. Color indicado
Tipo de análisis:	Cuantitativo, punto finalmente
Principio:	$\text{Urea} \xrightarrow{\text{Ureasa}} (\text{NH}_4)_2\text{CO}_3 (2\text{NH}_4^+ + \text{CO}_3^{2-})$ $\text{NH}_3 + \text{colorante indicador de pH} \longrightarrow$ $\longrightarrow \text{Cambio en el espectro de absorbancia del color}$
Usos:	Muy comúnmente usado
Comentarios:	Muy específico, usado con tecnología química seca
Método:	3. Conductimétrico
Tipo de análisis:	Cuantitativo, cinético
Principio:	$\text{Urea} \xrightarrow{\text{Ureasa}} (\text{NH}_4)_2\text{CO}_3 \rightarrow 2\text{NH}_4^+ + \text{CO}_3^{2-}$ <p>Aumento de iones que cambia la conductividad</p>
Usos:	Frecuentemente usado
Comentarios:	Muy específico, rápido
Método:	4. Electrodo ion-selectivo
Tipo de análisis:	Cuantitativo, enzimático, potenciométrico
Principio:	$\text{Urea} \xrightarrow{\text{Ureasa}} (\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ <p>NH_3 medido por electrodo</p>
Usos:	Raramente usado
Comentarios:	Muy específico. Puede aumentar su uso en el futuro
Método:	5. <i>o</i> -Ftalaldehído
Tipo de análisis:	Colorimétrico, cuantitativo, punto final
Principio:	$\text{Urea} + \textit{o}\text{-Ftalaldehído} \xrightarrow{\text{H}^+} \text{Isoindolina}$ $\text{Isoindolina} + 8\text{-(4-amino-1-metilamino)-6-metoxiquinolona} \xrightarrow{\text{H}^+} \text{Cromóforo (510 nm)}$



Usos:	Raramente usado
Comentarios:	Interferencias, a menudo aminas primarias
Método:	6.Diacetil monoxima
Tipo de análisis:	Colorimétrico, cuantitativo, punto final
Principio:	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{O} \\ \text{Diacetilmonoxima} \longrightarrow \text{Diacetilo} + \text{Hidroxilamina} \\ \text{H}^+ \\ \text{H}^+ \\ \text{Urea} + \text{Diacetilo} \longrightarrow \text{Diacina} + 2\text{H}_2\text{O} \end{array}$
Usos:	Raramente usado
Comentarios:	Alguna inespecificidad de reacción, usa reactivos peligrosos

Tabla 26-7.

Método	Rango de referencia para adultos (suero)	Salida urinaria de urea (dieta promedio)
1.Ureasa/GLDH	50 a 170 mg BUN/L (107 a 365 mg urea/L, 1.8 a 6.1 mmol/L)	7 a 16 g de BUN/24 horas (0.25 a 0.57 mol de urea/24 horas)
2.Ureasa conductividad	60 a 200 mg BUN/L (129 a 469 mg de urea/L, 2.2 a 7.2 mmol/L)	
3.Diacetil monoxima	80 a 260 mg BUN/L (172 a 558 mg de urea/L, 2.9 a 9.4 mmol/L)	

Tabla 26-8. Métodos para el análisis de ácido úrico.

Método:	1. Acido fosfotúngstico
Tipo de análisis:	Espectrofotométrico
Principio:	Oxidación del ácido úrico a alantoína y dióxido de carbono con reducción ácido fosfotúngstico a tungsteno azul (Amax 700nm)
Usos:	Suero, orina
Comentarios:	No específico, no es frecuentemente usado



Método:	2. Uricasa
Tipo de análisis:	Enzimático
Principio:	Oxidación del ácido úrico a alantoína, H_2O_2 y CO_2
Usos:	Suero, orina
Tipo de análisis:	a. absorción diferencial
Principio:	El ácido úrico absorbe en la región del espectro ultravioleta entre 290 y 293 nm (a $pH > 7$) y entre 283 nm (a $pH < 7$), pero la alantoína no
Comentarios:	Básico para un método candidato de referencia aumentada especificidad
Tipo de análisis:	b. colorimétrico
Principio:	Cuantificación de H_2O_2 producido especialmente cuando se acopla a una reacción indicadora de $NAD^+/NADH$
Comentarios:	La especificidad varía de método a método, la reacción de $NADH$ es ampliamente usada
Tipo de análisis:	c. polarográfico
Principio:	Mide la velocidad de consumo de oxígeno
Comentarios:	No es ampliamente usada, algunas interferencias
Método:	3. Cromatografía líquida de alta eficacia
Tipo de análisis:	Cromatográfico
Tipo de análisis:	a. espectrofotométrico
Principio:	Cromatografía de fase inversa
Usos:	Suero, orina
Comentarios:	Aumentada especificidad y sensibilidad
Tipo de análisis:	b. electroquímico
Principio:	Separación por intercambio iónico
Usos:	Suero, orina
Comentarios:	Método propuesto

Tabla 26-9. Métodos de análisis para de proteínas totales en orina.

Método:	1. Turbidimétrico
Principio:	Un agente desnaturizante precipita las proteínas; midiendo la turbidez resultante fotométricamente a 450 o 620 nm
Usos:	Método muy frecuentemente usado
Comentarios:	Técnicamente simple, rápido, bastante exacto
Método:	a. Ácido sulfosalicílico (SSA)
Sensibilidad:	10 a 25
Usos:	Método comúnmente usado
Comentarios:	Sobreestima la albúmina, que produce 4 veces mayor turbidez que las γ -globulinas



Método:	b. Acido tricloroacético (TCA)
Sensibilidad:	20
Usos:	No es frecuentemente usado
Comentarios:	Estima igual a la albúmina y las γ - globulinas
Método:	c. Cloruro de Bencetonio (BZC)
Sensibilidad:	10
Usos:	Método más frecuentemente usado
Comentarios:	Mayor sensibilidad que las técnicas turbidimétricas
Método:	2. Azul brillante de Commassie
Sensibilidad:	2.5
Principio:	El colorante se una al NH_3^+ de las proteínas con una absorción resultante a 595nm
Usos:	Frecuentemente usado
Comentarios:	Rápido, altamente sensible; sobreestima la albúmina
Método:	3. Pirogalol rojo
Sensibilidad:	35
Principio:	El colorante se una a grupos amino básicos formando un complejo azul medido fotométricamente a 600 nm.
Usos:	Frecuentemente usado
Comentarios:	Reacciona igual con albúmina y γ - globulinas
Método:	4. Biuret (modificado)
Sensibilidad:	5 a 17
Principio:	Las proteínas se concentran por precipitación con (TCA) o ácido etanólico-HCl-fosfotúngstico (reactivo Tsuchiya) Y se redisuelven en reactivo de biuret (alcalino- Cu^{++});el reactivo Cu^{++} forma un complejo coloreado con los enlaces peptídicos, lo cual es medido a 540 nm
Usos:	Usado por un pequeño porcentaje laboratorios
Comentarios:	Con el reactivo de Tsuchiya de este método es muy sensible con un buen rango lineal
Método:	5. Indicador de pH
Sensibilidad:	100
Principio:	Las proteínas (principalmente albúmina) unidas a un indicador de pH coloreada producen un cambio de color
Usos:	Método semicuantitativo; muy frecuentemente usado
Comentarios:	Reacciona primariamente con la albumina; da falso positivo con orina de $\text{pH}>8$

Figuras

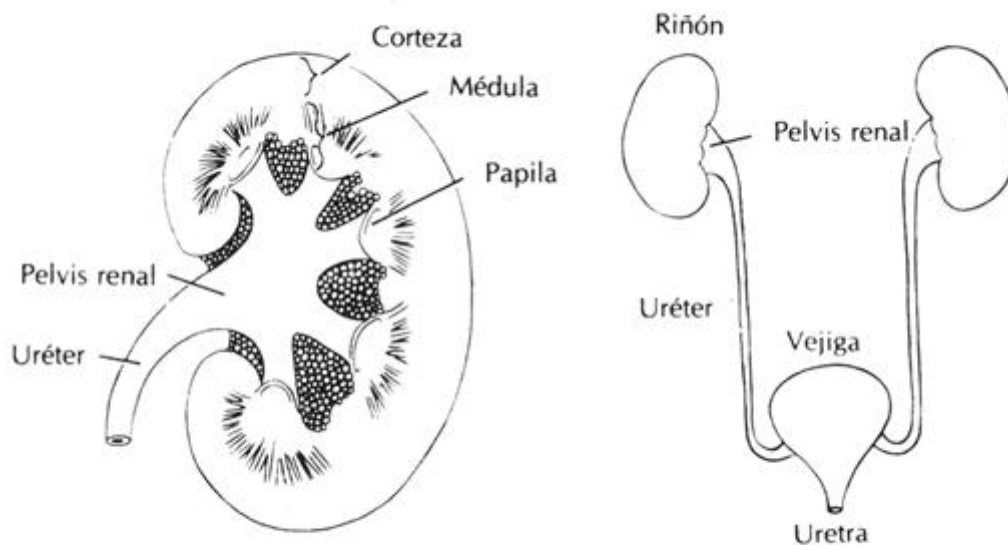


Figura 26-1 Anatomía macroscópica del riñón y del sistema urinario.

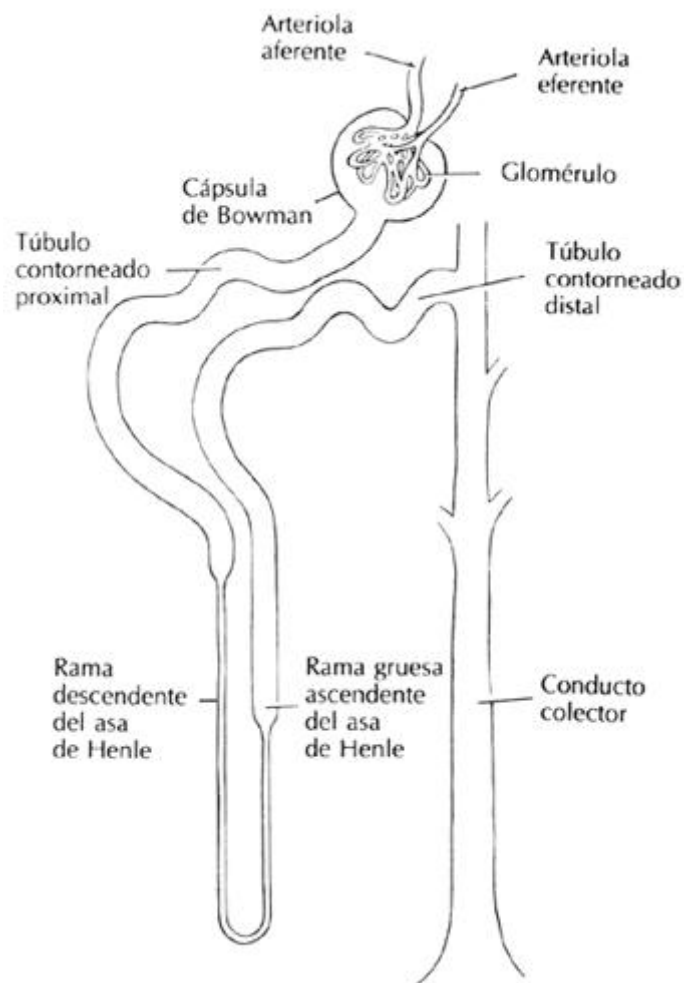


Figura 26-2 Componentes del nefrón.

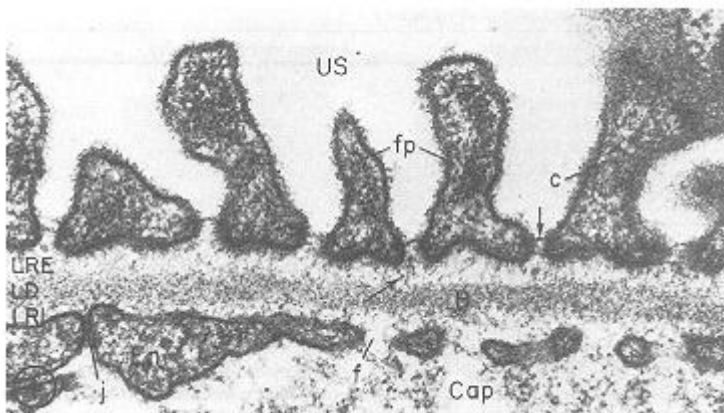


Figura. 26-3 Porción de un glomérulo que muestra una región periférica de un corte de asa capilar de una sección sana. La superficie de filtración consiste del endotelio (En) con su(s) fenestras (f) abiertas carentes de diafragmas, la membrana del soporte glomerular (B), y el proceso de pies epiteliales (fp) entre los que se encuentran las aberturas de filtración, conectadas en su base por membranas de abertura (flecha corta). Nótese que el GBM consiste de tres placas, una capa densa central, la lámina densa (LD), y dos capas contiguas de baja densidad, la lámina rara interna (LRI) y la externa (LRE). En la membrana del proceso de pies es visible una gruesa cubierta celular. La lámina densa está compuesta de una malla filamentosa fina (~3nm) y se observan filamentos finos que se extienden desde la lámina densa hasta las membranas endotelial y epitelial (*flechas largas*) en cualquiera de los lados. *Cap*, lumen capilar; *J*, unión entre dos células endoteliales; *US* espacios urinarios; 80,000 X. (From Farquhar MG, Kanwan YS: In cummings NB, Michael AF, Wilson CB, editors: *Immune mechanisms in renal disease*, New York, 1983, Plenum Medical Books.)

CAPÍTULO 27

27 Función Hepática

John E. Sherwin

Juan R. Sobenes

Anatomía y función normal del hígado

Metabolismo de los carbohidratos y función hepática

Metabolismo de las proteínas en el hígado

Biosíntesis y transporte de los lípidos en la función hepática

Funciones del hígado como depósito de almacenamiento

Formación de los pigmentos biliares

Excreción de los productos finales del metabolismo y desintoxicación

Alteraciones de la función hepática durante la enfermedad

Ictericia

Hepatitis

Daño hepático inducido por drogas

Síndrome de Reye

Síndromes de deficiencia congénita con función hepática alterada

Deficiencia en alfa1-antitripsina

Tumores hepáticos y otros desórdenes del hígado

Transplante de hígado

Pruebas de función hepática



Cambio de los compuestos analizados como consecuencia de la enfermedad

Enzimas

Otros compuestos analizados hepáticos

Métodos de análisis

Alanina aminotransferasa

Albumina

Fosfatasa alcalina

Aspartato aminotransferasa

Bilirrubina total

OBJETIVOS

- ♦ Explicar el papel del hígado en el metabolismo de los carbohidratos y el nitrógeno, en la formación de los pigmentos biliares y en la excreción de los productos finales del metabolismo y la desintoxicación.
- ♦ Describir las condiciones patológicas del hígado y las alteraciones bioquímicas del suero asociadas con estas enfermedades.
- ♦ Describir el procesamiento de la bilirrubina por parte del hígado, definir ictericia, y describir los diferentes estados patológicos asociados con la ictericia.
- ♦ Hacer una lista de las diferentes proteínas séricas derivadas del hígado y describir sus funciones.

Término Clave

canalículos biliares Canales muy delgados corriendo entre las células hepáticas.

células parenquimatosas Término general que designa los elementos funcionales de un órgano (ver hepatocito).

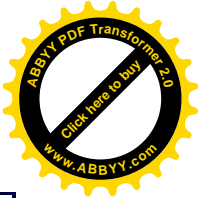
cirrosis Una enfermedad hepática caracterizada por la pérdida de la arquitectura microscópica normal debida a un proceso fibrótico. La cirrosis tiene una variedad de causas, pero generalmente es secundaria al abuso crónico de alcohol. También se puede causar cirrosis biliar obstructiva por la obstrucción de los ductos intrahepáticos o extrahepáticos mayores.

citocromo P-450 Una serie de proteínas celulares cuyos centros activos son grupos heme y que funcionan como portadores de electrones. Están implicados en las reacciones de hidroxilación de las drogas y otros xenobióticos. El 450 se refiere a la posición de la banda de absorción de Soret.

cuerpos cetónicos Compuestos que poseen grupos carbonilo.

Generalmente se denominan así el ácido acetoacético, la acetona y el ácido betahidroxibutírico (aunque este último compuesto no sea químicamente una cetona)

desintoxicación Proceso de modificación de la estructura química de una



sustancia extraña o de una sustancia tóxica con el objeto de hacerla menos tóxica o de facilitar su eliminación.

enfermedad de Gilbert Forma hereditaria benigna de hiperbilirrubinemia e ictericia causada por un defecto en la incorporación hepática de la bilirrubina no conjugada desde el suero.

enfermedad de Wilson Enfermedad hepatocelular asociada con una alteración del iris y del cristalino del ojo y provocada por un defecto en el metabolismo del cobre.

enfermedad hepatocelular Enfermedades en las cuales se destruyen las células hepáticas.

fibrosis periportal Depósito de fibras o material fibroso en las células que tapizan los vasos portales venosos del hígado.

glicogenólisis Degradación bioquímica de glicógeno para formar glucosa.

glucogénesis Formación bioquímica de glicógeno a partir de la glucosa.

gluconeogénesis Formación de glucosa a partir de lactato o aminoácidos mediante el ciclo de Cori.

hepatitis Inflamación del hígado provocada por una diversidad de infecciones, toxinas y otras causas, como la obstrucción del tracto biliar en la hepatitis obstructiva.

hepatobiliar Relativo al hígado y a los conductos biliares.

hepatocito Célula hepática parenquimatosa que realiza todas las funciones atribuidas al hígado.

ictericia Síndrome caracterizado por hiperbilirrubinemia, depósito de bilirrubina en la piel y membranas mucosas, provocando una coloración amarilla a la piel (también se conoce como “icterus”).

ictericia neonatal (ictericia fisiológica) Trastorno del recién nacido caracterizado por niveles elevados de bilirrubina no conjugada y causado por la inmadurez transitoria del hígado.

kernicterus Literalmente “ictericia nuclear”; es el resultado del depósito de bilirrubina no conjugada en los núcleos de las células nerviosas y del cerebro, causando destrucción celular y encefalopatía.

LCAT Lecitina colesterol acetiltransferasa; esterifica el colesterol con ácidos grasos.

mRNA Ácido ribonucleico mensajero; su información se traduce en proteínas específicas.

MSH Hormona estimulante de los melanocitos.

necrosis focal Muerte celular en un área pequeña de tejido.

porfirias Un grupo de trastornos causados por desórdenes del metabolismo de las porfirinas, con formación y excreción aumentada de porfirinas y sus precursores.

proteínas oncofetales Cualquier proteína, como la alfa fetoproteína producida por tumores embriológicos.

síndrome de Crigler-Najer Una forma familiar de ictericia no hemolítica causada por la ausencia de actividad de la glucorónido transferasa del hígado. Está



asociada con incrementos en la bilirrubina no conjugada sérica y desórdenes del sistema nervioso.

síndrome de Dubin-Johnson Forma familiar de ictericia no hemolítica crónica causada por un defecto en la excreción hepática de la bilirrubina conjugada.

síndrome de Reye Encefalopatía aguda, con frecuencia fatal y degeneración grasa del hígado, observada principalmente en la infancia.

xenobiótico Cualquier compuesto orgánico extraño al organismo como drogas y venenos orgánicos.

Anatomía y Función Normal del Hígado

El hígado es el órgano más grande del cuerpo y tiene como responsabilidad la producción de la mayoría de las fuentes de energía endógena usadas por el cuerpo. El hígado se divide en dos lóbulos primarios y se localiza en la cavidad abdominal justo debajo del diafragma. Las dos células primarias del hígado son los *hepatocitos* y las *células de Kupfer* (Fig. 27-1). Los hepatocitos del parénquima secretan los metabolitos a las venas o a los canalículos biliares. Los canalículos dispensan eventualmente los desechos al ducto biliar y la vesícula biliar. Los hepatocitos son los responsables por las funciones metabólicas del hígado.^{ref(633)}

El hígado es el órgano principal para el metabolismo de los carbohidratos, proteínas, lípidos, porfirinas y ácidos biliares. Es capaz de sintetizar la mayoría de las proteínas del cuerpo con excepción de las inmunoglobulinas, producidas por el sistema de las células plasmáticas linfocíticas. El hígado es también el sitio principal para el almacenamiento del hierro, glicógeno, lípidos y vitaminas. El hígado juega un papel importante en la desintoxicación de los xenobióticos y la excreción de los productos metabólicos finales como bilirrubina, amoníaco y urea.

Metabolismo de los carbohidratos y función hepática

Los polisacáridos son una forma de almacenamiento de energía. El hígado es capaz de producir glicógeno, el polisacárido principal de almacenamiento, por glucógenesis y degradando el glicógeno mediante la glicogenólisis. La reacción que predomine, ya sea la reacción de síntesis de glicógeno o la reacción de degradación, depende del estado metabólico del individuo. Con el fin de mantener la glucosa sanguínea constante sólo se dispone del glicógeno, puesto que solamente el hígado y los riñones contienen la enzima glucosa-6-fosfatasa, la cual convierte la glucosa-6- fosfato en glucosa. Aproximadamente el 10% de la glucosa del glicógeno está disponible para una liberación enzimática inmediata como resultado de la estructura altamente ramificada del glicógeno (ver Capítulo 32 para los detalles del metabolismo de la glucosa). En el adulto normal, el glicógeno hepático no es un depósito estático; por el contrario, suministra glucosa al resto del cuerpo con excepción del músculo. Bajo condiciones de estrés, los requisitos aumentados de energía requieren el aumento de la glucosa. Esto significa glicogenólisis y glicólisis. La glucosa adicional que el cuerpo requiera es suministrada por la secreción aumentada de glucosa del hígado. Esto es posible cuando se aumentan la velocidad de degradación del glicógeno y la velocidad de *gluconeogénesis*. La gluconeogénesis no es simplemente la inversión de la glicólisis, puesto



que varias de las enzimas glicolíticas, como la piruvato cinasa, la fosfofructokinasa y la hexokinasa, no son reversibles. El lactato y los aminoácidos sirven como precursores de la vía gluconeogénica. El uso por el hígado del ácido láctico sanguíneo (de origen muscular) es un factor importante en la depuración de este compuesto del suero. La gluconeogénesis es una fuente importante de glucosa sanguínea cuando se ha agotado el glicógeno hepático. El glicógeno hepático se agota cuando una persona ha permanecido varias horas en ayuno. El resultado neto de estas vías metabólicas es proveer una fuente constante de glucosa a la sangre para exportar a los tejidos periféricos o suplir los requerimientos de energía.

Metabolismo de las proteínas en el hígado

La mayoría de las proteínas séricas son sintetizadas en el hígado con dos excepciones en el adulto: la gamma globulina y la hemoglobina. En la infancia el hígado conserva la capacidad de sintetizar hemoglobina. Al igual que en la síntesis de carbohidratos, la función del hígado debe estar deteriorada de manera extensiva antes de poderse demostrar inequívocamente una disminución en la síntesis de proteínas. Las concentraciones normales de la mayoría de los subgrupos electroforéticos son bastante variables y dependen, en parte por lo menos, de la edad de la persona.

Muchas de las enzimas hepáticas exhiben vidas medias de varias semanas, aunque las proteínas estructurales son estables casi indefinidamente. Las proteínas del plasma sintetizadas por el hígado exhiben velocidades de síntesis y degradación variables (esto es, velocidades de recambio). Bajo condiciones normales la velocidad de síntesis de cada proteína es igual a la velocidad de degradación, puesto que su concentración en el plasma permanece constante. Muchas de las proteínas del hígado son excretadas al *líquido extravascular* para realizar funciones específicas. Entre estas funciones se incluyen nutrición, control de la presión sanguínea (presión oncótica) y transporte. La Tabla 27-1 da una lista de algunas de las proteínas encontradas en el plasma y algunas de sus propiedades.

Una de las proteínas séricas más importantes producidas en el hígado es la albúmina. Está presente en concentraciones de 40 a 50 g/L, y representa del 50% al 60% por peso de todas las proteínas del plasma. Esta molécula tiene una gama muy amplia de funciones, incluyendo nutrición, mantenimiento de la presión oncótica y el transporte del Ca^{++} , bilirrubina no conjugada, ácidos grasos libres, drogas y esteroides. Su papel multifactorial en la fisiología humana lo vuelven un compuesto importante para el monitoreo de la enfermedad hepática.

Varias de las proteínas de *reacción de fase aguda* también son sintetizadas en el hígado. Cuando el cuerpo se somete a estrés (como en la enfermedad infecciosa) se pueden elevar los niveles séricos de estas proteínas. Algunas de estas proteínas de reacción de fase aguda son usadas como marcadores de la enfermedad infecciosa como es el caso de la *proteína C-reactiva*. Otras como la *transtiretina (prealbúmina)* son usadas como marcadores del estado nutricional proteico de un individuo. Cuando el cuerpo tiene una deficiencia nutricional de proteínas, se disminuyen los niveles de prealbúmina y la medición de prealbúmina y albúmina pueden ser útiles para el diagnóstico y monitoreo de la desnutrición (ver capítulo 37).

Se encuentran presentes depósitos metabólicos de aminoácidos en el hígado. Los aminoácidos son sacados de estos depósitos para la síntesis de proteínas. La mayoría de estos aminoácidos constituyentes son devueltos a los depósitos intracelulares cuando la proteína se degrada. También se pueden usar los aminoácidos liberados en la gluconeogénesis, las

reacciones de transaminación o desaminación, o para ser reincorporados en proteínas nuevas. Las enzimas alanina aminotransferasa (ALAT, o antiguamente SGPT) y aspartato aminotransferasa (ASAT, o antiguamente SGOT) catalizan importantes reacciones de transaminación. En la persona sana que está en equilibrio nitrogenado, o con un balance positivo de nitrógeno, los grupos amino de los aminoácidos en exceso del suero, son excretados, previa conversión en amoníaco o urea.^{ref(634)} Algunos aminoácidos son excretados también sin cambio en la orina. Un balance nitrogenado negativo (es decir, nitrógeno dietético insuficiente), lleva a una disminución de los depósitos de aminoácidos y, por consiguiente, una disminución en la excreción de la urea.

Del 70% al 75% del nitrógeno no proteico del suero, está compuesto por urea, creatinina, amoníaco y ácido úrico. La urea es un 60% del total. La mayor parte del metabolismo del nitrógeno no proteico sucede en el hígado. La urea es producida en el hígado, porque es en este órgano donde se encuentra exclusivamente la arginasa, la enzima que convierte la arginina en urea y ornitina. Aunque la concentración sanguínea de amoníaco es usualmente bastante baja, 500 µg/L, el amoníaco es un intermediario importante en la síntesis de aminoácidos. Entre las fuentes de amoníaco se incluyen la oxidación hepática del glutamato a oxoglutarato, la transaminación y desaminación oxidativa de aminoácidos y catecolaminas, y la degradación bacteriana de la urea en el intestino. La mayoría del amoníaco sanguíneo se forma en este sitio. La síntesis de glutamato, glutamina y carabamil fosfato es el mecanismo primario para realizar la eliminación metabólica del amoníaco. El carbamil fosfato se puede usar para la síntesis de ácido orótico y finalmente pirimidinas, necesarias para los ácidos nucleicos, o para sintetizar urea, lo cual es el camino principal para la excreción del exceso de nitrógeno.

Biosíntesis y transporte de los lípidos en la función hepática.

Para todo propósito práctico, lípidos se incluyen solamente los ácidos grasos libres, los triglicéridos, los glicerofosfatos, los esfingolípidos, el colesterol y los ésteres de colesterol. La estructura química general de estos lípidos se muestra en el capítulo 53, y su metabolismo se discute en el capítulo 33.

La síntesis hepática de lípidos ocurre como respuesta a una consumación excesiva de carbohidratos, y al consumo normal de lípidos en la dieta. El carbohidrato en exceso es convertido en acetil coenzima A (acetil CoA) y un sistema citoplasmático enzimático lo convierte en el ácido graso, ácido palmítico, usando la nicotinamida adenina difosfonucleótido reducida (NADPH) y trifosfato de adenosina, los cuales también son productos del metabolismo de la glucosa.

En el hígado, los ácidos grasos son degradados hasta acetil CoA, los cuales pueden ser oxidados posteriormente a CO₂ mediante el ciclo del ácido cítrico. Sin embargo, una porción pequeña de acetil CoA se convierte en cuerpos cetónicos, tales como acetoacetato, beta-hidroxibutirato y acetona. En el individuo normal, estos productos se encuentran en la sangre en una cantidad de apenas 30 mg/L. Si ocurre una movilización excesiva de ácidos grasos, como en la cetoacidosis diabética o en la intoxicación alcohólica, se produce una síntesis aumentada de cuerpos cetónicos en el hígado, debido a cantidades limitantes de NAD y NADP.

El hígado reempaca los lípidos provenientes de la dieta y los secreta en forma de lipoproteínas de muy baja densidad, ricas en triglicéridos. Estas son convertidas



posteriormente en lipoproteínas de baja densidad para llevar el colesterol a las células periféricas. El colesterol también es sintetizado en el hígado, mediante los microsomas a partir de acetyl CoA. Aproximadamente el 70% del colesterol total del plasma se esterifica con ácidos grasos mediante la enzima lecitina-colesterol acetiltransferasa, la cual también es producida en el hígado. A partir del colesterol, las células que tapizan los canalículos biliares y los ductos del hígado, producen ácidos biliares.^{ref(635)} Estos ácidos, son los metabolitos finales de excreción del colesterol. También ayudan en la digestión de los lípidos de la dieta (ver capítulo 30). Aproximadamente el 80% del colesterol disponible se convierte en los cuatro ácidos biliares principales (Tabla 27-2). Los ácidos biliares primarios son el cólico y el quenodeoxicólico, que están presentes en un exceso de 5 a 10 veces con respecto a los ácidos biliares secundarios, los ácidos deoxicólico y litocólico, los cuales son producidos por el metabolismo de los ácidos biliares hepáticos primarios mediante las bacterias intestinales.

Los ácidos biliares se colectan en los canalículos biliares y ductos, y se almacenan en la vesícula. Luego son transportados al lumen intestinal, donde emulsifican a los lípidos ingeridos. Esta emulsificación de lípidos permite que la mucosa intestinal digiera los lípidos y absorbe los triglicéridos liberados y el colesterol. Más del 90% de los ácidos biliares secretados se reabsorben y regresan al hígado a través de la circulación portal.^{ref(636)}

Funciones del hígado como depósito de almacenamiento

El hígado es un sitio importante para el almacenamiento de hierro, glicógeno, aminoácidos y algunos lípidos y vitaminas. El hígado adulto contiene aproximadamente 700 mg de hierro. El hierro nutricional se absorbe primordialmente en el intestino. Para ser absorbido, el ion férrico (Fe^{3+}) se debe convertir en ion ferroso (Fe^{2+}). Inmediatamente después de la absorción, el Fe^{2+} se reconvierte en Fe^{3+} y se almacena temporalmente en la mucosa intestinal como un complejo de ferritina. La apoproteína ferritina se sintetiza en el hígado. Posteriormente, el hierro se libera una vez más como Fe^{2+} al plasma y se oxida rápidamente en Fe^{3+} y se compleja con la transferrina, una α_1 -globulina sintetizada en el hígado. En el adulto sano, la transferrina está saturada en un 25%-30% con Fe^{3+} . En el hígado, la transferrina libera el hierro y se forma un complejo nuevo ferritina- Fe^{3+} . La ferritina es la forma de almacenamiento principal del hierro; la apoferritina, liga el hierro como óxido férrico hidratado coloidal. Sin embargo, una pequeña cantidad de hierro se almacena en la forma de hemosiderina, una inclusión celular insoluble de Fe^{3+} acomplejada a la ferritina. Los gránulos de hemosiderina sirven como una forma de almacenamiento para el hierro cuando hay niveles insuficientes de apoferritina. La relación hierro a proteína es mucho mayor en la hemosiderina que en la ferritina. Detalles adicionales del metabolismo del hierro pueden ser encontrados en el capítulo 35.

Los lípidos se almacenan principalmente como triglicéridos en el tejido adiposo subcutáneo. Los lípidos se almacenan también en el hígado donde funcionan como una reserva de energía. Bajo circunstancias normales, el hígado funciona como una bodega para el almacenamiento temporal de los lípidos a medida que son sintetizados en el hígado, o absorbidos por el intestino después de una comida.

Formación de los pigmentos biliares

Aproximadamente 126 días después de ser liberados por el tejido retículoendotelial, los eritrocitos seniles son fagocitados y la hemoglobina es liberada. La porción hemo de la



hemoglobina se convierte en bilirrubina, con la liberación del hierro y las globulinas. El hierro liberado se une a la transferrina y se devuelve a los depósitos de hierro del hígado o de la medula ósea; la globina es degradada en sus aminoácidos constitutivos. La conversión del hemo a bilirrubina requiere de dos a tres horas (Fig. 27-2). La bilirrubina, unida a la albúmina es transportada de las células reticuloendoteliales a los hepatocitos. En el hígado, la bilirrubina se transporta a través de los microvellos celulares a los sinusoides hepáticos. La bilirrubina se disocia de la albúmina después de ser captada por los hepatocitos a través de proteínas específicas. Dentro del hepatocito, se forma el glucorónido de bilirrubina por la reacción de la bilirrubina con uridin difosfoglucoronato (UDP-glucoronato), en presencia de la UDP-glucoroniltransferasa. Se encuentran aproximadamente 8-10 mg/L de bilirrubina no conjugada en el suero adulto normal. La reacción corriente de conjugación (85% a 90%) corresponde a la formación de diglucorónido de bilirrubina, pero en estados de enfermedad, se producen los monoglucorónidos como resultado de la acumulación de bilirrubina no conjugada provocada por un suministro limitado de glucoronato. En estados patológicos, una fracción pequeña de bilirrubina no conjugada se conjuga también covalentemente a la albúmina. Esta fracción de la bilirrubina llamada *bilirrubina delta* reacciona del mismo modo que la bilirrubina conjugada con la mayoría de los análisis químicos usados para medir esa fracción.

Después de haber sido formado, el diglucorónido de bilirrubina es excretado por el hepatocito a los canalículos biliares. Cualquier enfermedad que produzca una secreción disminuida de la bilirrubina conjugada provocará un incremento en la concentración sérica de este compuesto analizado. Estos conjugados, solubles en agua, son secretados a la luz intestinal como parte de la bilis. Los conjugados de bilirrubina son hidrolizados por una beta-glucoronidasa y la bilirrubina regenerada se convierte en *d*-urobilinógeno la cual a su vez, se reduce posteriormente, gracias a la acción de las bacterias anaeróbicas de la luz intestinal, a *l*-urobilinógeno y *l*-estercobilinógeno. Los urobilinógenos son reabsorbidos del intestino y reciclados por la circulación extrahepática, donde son excretados finalmente por la orina. El estercobilinógeno, no es reabsorbido del intestino, convirtiéndose en un componente normal de las heces (Fig. 27-3). (Ver el capítulo 35 con respecto a detalles adicionales del metabolismo de la bilirrubina.)

Excreción de los productos finales del metabolismo y desintoxicación

Los humanos tienen dos mecanismos para realizar la desintoxicación de materiales extraños (xenobióticos), tales como drogas y venenos, y de productos tóxicos metabólicos como el amoníaco y la bilirrubina. El primer mecanismo consiste en unir el material reversiblemente a una proteína de tal manera que el material se inactive; de esta forma, la bilirrubina se une a la albúmina, y el plomo a la hemoglobina. El segundo mecanismo consiste en modificar el compuesto químicamente de tal manera que se pueda excretar fácilmente; como ejemplo tenemos que el amoníaco se convierte en urea, y la bilirrubina se convierte en glucorónido de bilirrubina.

Los compuestos exógenos son inactivados y desintoxicados a través de un mecanismo de hidroxilación mediado por una de las enzimas del citocromo P-450 o, por conjugación del compuesto inicial, o sus metabolitos, con sulfatos o carbohidratos. Estas reacciones están localizados en los microsomas del hígado. Los compuestos sulfatados son más solubles en agua que el compuesto original y son excretados directamente en la orina. Los conjugados



con carbohidratos son excretados comúnmente a la luz intestinal como parte de la bilis.

Alteraciones de la Función Hepática Durante la Enfermedad

Ictericia

La ictericia es una condición general provocada por el metabolismo anormal o la retención de la bilirrubina. La ictericia le produce una coloración amarilla a la piel, membranas mucosas y escleras. Se puede observar la ictericia típicamente con niveles de bilirrubina sérica de aproximadamente 50 mg/dL. Los tres tipos principales de ictericia son la prehepática, la hepática y la posthepática.

La *ictericia prehepática* es el resultado de las anemias hemolíticas agudas o crónicas. La *ictericia hepática* incluye los trastornos del metabolismo de la bilirrubina y los defectos en el transporte tales como la enfermedad de Crigler-Najer, el síndrome de Dubin-Johnson y la enfermedad de Gilbert, así como la ictericia fisiológica del recién nacido y enfermedades que provocan la injuria o la destrucción hepatocelular.

Cada una de las enfermedades específicas del metabolismo de la bilirrubina representa un defecto en una de las etapas del procesamiento hepático de la bilirrubina sérica (Fig. 27-4). Por lo tanto, la *enfermedad de Gilbert* es causada por un defecto en el transporte de la bilirrubina de la albúmina plasmática al hepatocito. Aunque se presentan niveles elevados de bilirrubina no conjugada en este desorden familiar, no se elevan los niveles de bilirrubina conjugada. Un daño en la conjugación con el UDP- glucorónido, causada por una deficiencia de la enzima UDP-glucoroniltransferasa también provocará un incremento grande en la bilirrubina no conjugada. Cuando la deficiencia es congénita, se conoce como la *enfermedad de Crigler-Najer*.

Sin embargo, las deficiencias en la glucoronil transferasa se encuentran con mayor frecuencia en la *ictericia neonatal o fisiológica*.^{ref(637)} La actividad de esta enzima es una de las últimas funciones que se activan en la vida prenatal, ya que la bilirrubina no conjugada formada por el feto es eliminada por la placenta a la sangre materna. Sin embargo, en nacimientos prematuros, los infantes nacen algunas veces sin que la actividad enzimática se haya establecido. Esto provoca un incremento rápido de bilirrubina no conjugada que puede poner en riesgo la vida. La bilirrubina no conjugada, que es mucho más liposoluble que hidrosoluble, pasa al cerebro y las células nerviosas y se deposita en los núcleos de estas células provocando el *kernicterus*. El kernicterus ocasiona con frecuencia daño celular y muerte. La ictericia neonatal persistirá hasta que la glucoronil transferasa sea producida por el hígado del recién nacido.^{ref(638)} La sangre del recién nacido debe ser examinada con frecuencia para que puedan ser detectados los niveles peligrosamente altos de bilirrubina (aproximadamente 200 mg/L). En este momento, el infante debe ser tratado ya sea con radiación ultravioleta, para destruir la bilirrubina cuando pasa a través de los capilares de la piel, o por exanguinotransfusión.^{ref(639)} La vigilancia permanente de la bilirrubina sérica en los infantes prematuros es de particular importancia. Estos infantes tienen un riesgo mayor de una encefalopatía inducida por la bilirrubina, puesto que (1) la barrera hemato-encefálica puede estar incompleta, (2) estos infantes con frecuencia tienen concentraciones más bajas de albúmina que los niños normales, (3) existe una acidosis, mediante la cual los iones hidrógeno pueden desplazar a la bilirrubina de la albúmina y (4) son tratados con sustancias que pueden desplazar la bilirrubina de la albúmina como ácidos grasos libres, en los líquidos de la



hiperalimentación, o drogas como la fenitoína (Dilantin) o el fenobarbital. En los hospitales donde los bebés tienen riesgo de hepatitis, también pueden ser necesarias las mediciones de la bilirrubina conjugada (ver más abajo).

La última etapa en el procesamiento hepático de la bilirrubina es la etapa de postconjugación en la cual se excreta el glucorónido de bilirrubina de los microsomas hepáticos a los canalículos. La dificultad en realizar este proceso, llamado el *síndrome de Dubin-Johnson*, provoca grandes incrementos en la bilirrubina conjugada sérica y la orina muestra presencia de bilirrubina.

Se ha promocionado la medición de la bilirrubina delta (δ -bili) como una manera mejor de evaluar la hiperbilirrubinemia resultante de la enfermedad hepática obstructiva. La fracción δ -bili tiene una vida media sérica mayor que las otras fracciones. [ref\(640\)](#) Si se encuentra elevada en concentraciones significativas, puede provocar un descenso aparentemente más lento en la caída de la bilirrubina sérica dando una falsa impresión de una falta de progreso a medida que la enfermedad hepática responde al tratamiento.

La ictericia hepática incluye los desórdenes caracterizados por daño hepatocelular o necrosis, tales como hepatitis o cirrosis. La *ictericia posthepática* es causada generalmente por una enfermedad obstructiva biliar provocada por espasmos o contracciones del tracto biliar, la oclusión dúctil por cálculos o compresión por enfermedad neoplásica. Puesto que en estas enfermedades las funciones hepáticas de transporte y conjugación de la bilirrubina son normales, el incremento mayor en la bilirrubina sérica implica a la fracción conjugada. Debido a la imposibilidad de ser excretada adecuadamente por el hígado, en estos desórdenes aumenta la fracción de bilirrubina conjugada en el suero, con el resultado de la aparición de bilirrubina en la orina. Si la enfermedad hepatocelular es suficientemente severa para provocar ictericia, se aumentan tanto las fracciones de bilirrubina conjugadas como no conjugadas. La razón es el daño general en el metabolismo de la bilirrubina. Los hallazgos de laboratorio en estas enfermedades para la bilirrubina y sus metabolitos se resumen en la Tabla 27-3.

Hepatitis

La hepatitis es un término general que significa 'inflamación del hígado', y se usa para describir enfermedades que producen daño hepatocelular. La hepatitis es causada usualmente por agentes infecciosos o tóxicos. La hepatitis viral es la causa más común de enfermedad hepatocelular aguda. Se han identificado cuatro tipos de virus de hepatitis: el virus de tipo A, el virus de tipo B, el virus de tipo C y el virus de hepatitis delta. Se ha considerado este último virus como defectuoso, requiriendo la presencia del virus tipo B para infectar. Sin embargo, ya no se cree que el virus delta sea biológicamente defectuoso, pero puede requerir el virus de la hepatitis B (VHB) para producir la enfermedad. En todo caso la coinfección de ambos virus provoca una enfermedad hepática crónica más agresiva que la infección por el VHB únicamente. [ref\(641\)](#) Los síntomas clínicos de los cuatro tipos son similares y la mayoría de los casos de hepatitis son anictéricos debido a que a pesar de la necrosis hepática el hígado retiene una capacidad funcional para manejar la carga de bilirrubina provocada por la degradación de la hemoglobina. También pueden causar hepatitis virus como el citomegalovirus, el virus coxsackie tipo B, y el virus de Epstein-Barr.

Los niveles séricos de ALAT y ASAT se elevan rápidamente durante el curso inicial de la hepatitis debido a la necrosis hepática. En pacientes que presentan ictericia la elevación en

las transaminasas precede el aumento en la bilirrubina, la cual persiste por 2 a 8 semanas. La ASAT se eleva usualmente más que la ALAT. La fosfatasa alcalina sérica y la γ -glutamyltransferasa (GGT) se elevan durante la porción colestática temprana de la enfermedad y permanecen elevadas hasta que la enfermedad se resuelve. El diagnóstico del tipo de hepatitis viral se realiza a través de la medición del antígeno de hepatitis específico durante la fase prodrómica de la enfermedad. Se pueden detectar anticuerpos específicos a los antígenos virales por varias semanas después de que ya no se pueda detectar el antígeno. Generalmente el resultado de la persistencia de la infección por hepatitis B, es la hepatitis crónica. Está asociada con la elevación de bilirrubina sérica de manera mínima pero persistente, transaminasas séricas elevadas (esta vez con la ALAT más alta que la ASAT), debido a la necrosis hepática, y, ocasionalmente fosfatasa alcalina elevada.

Daño hepático inducido por fármacos

La causa más común de daño hepático inducido por drogas es la ingestión crónica excesiva de alcohol. Los hallazgos de laboratorio asociados con este daño son una elevación de la GGT, una elevación ligera de las transaminasas, un aumento en la fracción de la globulina con una disminución en la fracción de la albúmina del suero y una disminución de la sulfobromoftaleína (Bromosultaleína, BSP) o la depuración del verde de indocianina. (Ver capítulo 34 para una revisión detallada de la enfermedad alcohólica del hígado).

Otra clase de drogas que inducen daño hepático son los barbitúricos, los antidepresivos tricíclicos, los antiepilépticos, la isoniazida y el acetaminofén. Estas drogas elevan típicamente la GGT sérica. El acetaminofén es altamente hepatotóxico. Las sobredosis requieren un monitoreo cuidadoso para prevenir la muerte por falla hepática. La suspensión de la droga permite la regeneración hepática. Las drogas quimioterapéuticas como la vincristina, la vinblastina, la actinomicina D, y el 5 fluorouracilo, causarán típicamente una elevación de las transaminasas séricas y la deshidrogenasa láctica debido al daño tisular hepático y la liberación de las enzimas.

Síndrome de Reye

El síndrome de Reye ocurre típicamente en los niños entre 2 y 13 años de edad. El hígado presenta una infiltración grasa con necrosis y colestasis, y se presenta una encefalopatía debido a una acumulación de amoníaco. Los hallazgos de laboratorio incluyen un amoníaco sanguíneo elevado, transaminasas séricas elevadas y un tiempo de protrombina prolongado.

Síndromes de deficiencia congénita con función hepática alterada

Porfirias.

Las porfirias son causadas por deficiencias enzimáticas congénitas en los caminos que llevan a la síntesis de la fracción heme de la hemoglobina y otras proteínas heme como son la mioglobina y los citocromos. Se observa la excreción aumentada de los metabolitos específicos de las porfirinas. Los cinco tipos de porfiria son: porfiria intermitente aguda, porfiria adquirida congénita hepática, porfiria eritropoyética y protoporfiria eritropoyética. El capítulo 35 resume el metabolismo de las porfirinas y ofrece una discusión sobre los defectos enzimáticos.



Enfermedad de Wilson.

La enfermedad de Wilson es un desorden autosómico recesivo del metabolismo del cobre. La acumulación del cobre en el hígado produce ictericia seguida por cirrosis hepática. La enfermedad de Wilson se caracteriza por una concentración baja en suero de ceruloplasmina, glucosuria, fosfaturia, aminoaciduria y una concentración urinaria de cobre elevada con excreciones superiores a 50 µg/día.

Hemocromatosis.

La hemocromatosis es otro desorden genético del metabolismo de los metales. En esta enfermedad se acumula el hierro en el hígado, y la cirrosis resultante es similar a la cirrosis alcohólica. Son características de este desorden un hierro sérico elevado, una capacidad de combinación del hierro baja y una ferritina sérica elevada en la presencia de un consumo dietético normal de hierro.

Deficiencia en α_1 -antitripsina

La deficiencia en α_1 -antitripsina es un error innato del metabolismo proteico que provoca enfisema y cirrosis hepática. Se han identificado varios fenotipos de α_1 -antitripsina, cada uno con un riesgo variado de la enfermedad. [ref\(642\)](#) El daño tisular visto en las deficiencias de α_1 -antitripsina puede ser causado por el daño hidrolítico a las proteínas estructurales por enzimas similares a la tripsina que no han sido neutralizadas por la α_1 -antitripsina. Puesto que la α_1 -antitripsina representa aproximadamente el 80% de la fracción α_1 de las proteínas séricas en la electroforesis, la deficiencia severa se diagnostica por la ausencia de esta fracción en el electroforetograma. La mejor manera para hacer la fenotipificación de las diferentes variantes de deficiencia en α_1 -antitripsina es por enfoque isoeléctrico.

Otros desórdenes genéticos asociados con la enfermedad hepática incluyen las enfermedades de almacenamiento de lípidos y las enfermedades de almacenamiento de glicógeno. Estas se discuten en detalle en el capítulo 48.

Tumores hepáticos y otras enfermedades del hígado

La mejor forma para diagnosticar la fibrosis hepática congénita, los quistes hepáticos y los abscesos hepáticos es por biopsia hepática. Sin embargo estos desórdenes pueden estar acompañados por cambios no específicos en las enzimas hepáticas y la retención del verde de indocianina. Los tumores hepáticos alteran frecuentemente la función hepática como consecuencia de compresión tisular durante los procesos de crecimiento tumoral y de infiltración. Esto provoca un aumento en la fosfatasa alcalina sérica, la 5'-nucleotidasa y especialmente la GGT. Las depuraciones de BSP y verde de indocianina se prolongan con frecuencia. La demostración de alfafetoproteína sérica es diagnóstica de un tumor hepático en presencia de una tomografía hepática anormal.

Transplante de hígado

Los trasplantes de hígado se han vuelto muy comunes y aproximadamente entre el 85% y el 90% de los pacientes tienen una supervivencia de mínimo un año de su primer trasplante. Es

importante monitorear estos pacientes en cuanto a su función así como por signos de rechazo.^{refs(643)} Se usan tanto la ciclosporina A y el FK-506 (Tacrolimus) como agentes inmunosupresores para contribuir a la aceptación del injerto. Es necesario monitorizar las concentraciones de estas drogas en sangre total para mantener concentraciones efectivas de la droga.

Se ha reportado que la medición del factor de necrosis alfa^{ref(644)} así como de la endotoxina plasmática dan una buena indicación del rechazo del injerto. También se ha reportado que la medición del monoetilglicinxiliduro después de haber administrado lidocaína es útil en la evaluación de la función del hígado del donante así como de la pérdida por parte del receptor de la función del hígado transplantado. En aquellos pacientes que reciben un trasplante renal debido a una hepatitis viral, la medición de la hepatitis delta puede ser útil con el fin de determinar si el hígado transplantado se ha infectado posteriormente al trasplante.^{ref(645)} Con frecuencia sucede que la evidencia de la reinfección viral precede en meses a la evidencia de la diseminación del VHB.

Se puede evaluar el mantenimiento de la función hepática post-trasplante mediante la medición de enzimas tradicionales del hígado como la ALAT, la deshidrogenasa láctica (DHL), GGT, y la fosfatasa alcalina junto con otras pruebas, tales como el tiempo de protrombina. La interpretación de estas pruebas se hace de la misma forma que en los demás pacientes.

Pruebas de Función Hepática

Las pruebas de función hepática se usan para identificar la enfermedad hepática en ausencia de ictericia, o cuando la ictericia es el resultado de la enfermedad hemolítica y se sospecha la existencia de una enfermedad hepática complicada. Se prueba la función hepática mediante la inyección de un colorante intravascular y la observación de la retención del colorante en el suero. Es esencial que se escoja un colorante que se excrete por vía biliar, en vez de ser filtrado por el riñón. Es por esto que el verde de indocianina es aceptable, mientras que la fenolsulfonftaleína no lo es, por ser eliminada preferencialmente por la orina. La retención del verde de indocianina depende del flujo sanguíneo del hígado, la función de los ductos biliares y la función celular hepática. Por tanto, estas pruebas no pueden diferenciar entre la enfermedad hepatocelular y la enfermedad obstructiva hepática. En la persona normal, el porcentaje de retención es menor del 5% a los 45 minutos. Un aumento en la retención coincide con disfunción del hígado provocada por la enfermedad hepatocelular, la enfermedad biliar obstructiva y lesiones que ocupen espacio como los tumores del hígado. Se debe hacer énfasis que la prueba de la BSP ya no se hace de rutina debido a que puede causar anafilaxis en algunos pacientes.

Un segundo grupo de pruebas para la función hepática relaciona los cambios en la capacidad del hígado para metabolizar drogas, a los cambios en la concentración sérica de la droga original o su metabolito, o en la velocidad de excreción del metabolito de la droga en la orina.

Cambios del Compuesto Analizado en la Enfermedad



Los cambios de los compuestos analizados séricos con la enfermedad están resumidos en la Tabla 27-4.

Enzimas

En esta sección se describirán seis enzimas séricas y se examinará su valor en el diagnóstico diferencial de la enfermedad hepática. Las enzimas que se discutirán son la fosfatasa alcalina, la GGT, la ASAT, la ALAT, la 5'-nucleotidasa y la deshidrogenasa láctica. Se han identificado muchas otras enzimas útiles en la evaluación de la enfermedad hepática. Sin embargo, estas seis enzimas son las más comúnmente usadas. Se muestran ejemplos de como cambia la actividad con el tiempo para varias de estas enzimas en la enfermedad hepática en las Figs. 27-5 a 27-7.

Fosfatasa alcalina (EC 3.1.3.1).

La fosfatasa alcalina es realmente un grupo de enzimas que hidrolizan los ésteres de monofosfatos a un pH alcalino. El pH óptimo para estas enzimas es generalmente de aproximadamente 10. No se conocen los substratos naturales para la fosfatasa alcalina. La enzima ha sido identificada en la mayoría de los tejidos corporales y se localiza generalmente en las membranas celulares. La actividad más alta de la fosfatasa alcalina se observa en el hígado, los huesos, el intestino, el riñón y la placenta, y se han identificado por lo menos 11 isoformas diferentes de la fosfatasa alcalina en el suero. Puesto que la fosfatasa alcalina contiene normalmente cantidades significativas de ácido siálico, la mayoría de estas formas múltiples de la enzima son el resultado de diferentes grados de sialación. Se sabe que la enzima producida por la placenta tiene una composición proteica diferente de las otras composiciones enzimáticas.

La medición de la fosfatasa alcalina sérica es útil para diferenciar la enfermedad hepatobiliar de la enfermedad osteogénica. La actividad de la fosfatasa alcalina aumenta mucho (10 veces) como resultado de una síntesis localizada en la membrana después de una obstrucción extrahepatobiliar tal como la colestasis o los cálculos biliares. La obstrucción biliar intrahepática también se ve acompañada por una elevación de la actividad de la fosfatasa alcalina sérica, pero el grado de incremento es mucho menor (2 a 3 veces). La enfermedad hepática que produce necrosis de las células del parénquima no eleva la fosfatasa alcalina sérica a menos que la enfermedad hepática esté asociada con daño a los canalículos o con estasis biliar.

Es muy complicada la interpretación de la medición de la fosfatasa alcalina sérica, debido a que la actividad de la enzima puede aumentar en ausencia de enfermedad hepática. Los desórdenes más comunes que producen una elevación de la fosfatasa alcalina son las enfermedades óseas, como la enfermedad de Paget, el raquitismo y la osteomalacia. También se incrementa la actividad de la fosfatasa alcalina sérica durante la pubertad debido al crecimiento acelerado de los huesos, y durante el tercer trimestre del embarazo debido a la liberación de la fosfatasa alcalina por la placenta (ver pag 521 para los métodos).

Gama-glutamyltransferasa (EC 2.3.2.2).

La GGT (o γ -GT) es una enzima localizada en la membrana que juega un papel importante en el metabolismo del glutatión y en la reabsorción de los aminoácidos del filtrado



glomerular y de la luz intestinal. El glutatión (γ -glutamilcisteinilglicina) en presencia de la GGT y un aminoácido o péptido transfiere el glutamato al aminoácido formando un enlace péptido en el ácido γ - carboxílico, formando, por consiguiente, cisteinilglicina y el péptido γ -glutamil correspondiente.

Aunque la mayor actividad de la GGT se presenta en el tejido renal, la elevación de la GGT es generalmente el resultado de la enfermedad hepática. La GGT sérica se eleva antes que las otras enzimas hepáticas en enfermedades como la colecistitis aguda, la pancreatitis aguda, la necrosis hepática aguda y subaguda, y neoplasias de sitios múltiples que cursan con metástasis hepáticas. Puesto que la GGT es una enzima microsomal hepática, la ingestión crónica de alcohol o drogas como los barbitúricos, los antidepresivos tricíclicos y los anticonvulsivantes inducen la producción de enzimas microsomales. Estas elevaciones inducidas por drogas preceden cualquier otro cambio en las enzimas del hígado, y si se suspende la ingestión de la droga en ese momento los cambios del hígado son generalmente reversibles. La GGT permite la diferenciación de las enfermedades hepáticas de otras condiciones en las cuales se eleva la fosfatasa alcalina sérica puesto que los niveles de GGT son normales en la enfermedad de Paget, el raquitismo y la osteomalacia y en los niños y mujeres embarazadas sin enfermedad hepática. Puesto que la próstata tiene una actividad significativa de GGT, la actividad sérica es mayor en hombres sanos que en mujeres. La mayor utilidad de la GGT es en el diagnóstico de colestasis causadas por la ingestión crónica de alcohol o drogas, colestasis mecánicas o virales, metástasis hepáticas, desórdenes óseos con elevaciones de la fosfatasa alcalina, pero en los que la GGT es normal y desórdenes de músculo esquelético en los cuales la transaminasa ASAT está elevada pero la GGT está normal.

5'-Nucleotidasa (EC3.1.3.5).

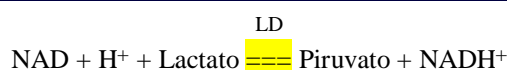
La 5'-Nucleotidasa (NTD) es una enzima localizada en los microsomas y las membranas celulares que cataliza la hidrólisis de los ésteres 5'-fosfato nucleósidos. La enzima sérica tiene un pH óptimo aparente de 7.5:



Al igual que la GGT, la NTD sérica se eleva en las enfermedades hepatobiliares tales como obstrucción por cálculos del ducto biliar, colestasis biliar, cirrosis y enfermedad obstructiva causada por crecimiento neoplásico. Sin embargo, la NTD no se eleva generalmente en daño hepático inducido por drogas.^{ref(646)} Por esto es útil medir la NTD junto con la GGT para seguir el curso de la quimioterapia para neoplasias del hígado. Puesto que la NTD no se eleva en la enfermedad ósea, al igual que la GGT es útil para diferenciar las causas hepáticas para la elevación en la fosfatasa alcalina, de otras causas, tales como las enfermedades óseas, el embarazo y crecimiento normal.

Deshidrogenasa láctica (EC 1.1.1.27).

La deshidrogenasa láctica está presente en muchos tejidos. La DHL cataliza la interconversión de piruvato y lactato:



La mayor actividad de la DHL se presenta en el riñón y el corazón, y la menor en el pulmón y el suero. La DHL se localiza en el citoplasma celular y es por tanto liberada al suero cuando las células se dañan o necrosan (ver pág. 608 para los métodos).

Cuando solamente está implicado un órgano específico, como el hígado, la medición del la DHL total puede ser útil. La DHL se incrementa en las hepatitis virales o tóxicas, en la obstrucción biliar extrahepática, en la necrosis aguda del hígado y en la cirrosis del hígado. Sin embargo, en condiciones en las que puedan estar implicados varios órganos la medición del DHL total es menos útil que la medición de las isoenzimas de la DHL. Las isoenzimas DHL₅ y DHL₄ son las responsables de la actividad primaria del hígado, mientras que las isoenzimas DHL₁ y DHL₂ son las responsables por la actividad predominante de la DHL en el corazón y el riñón. Puesto que los glóbulos rojos también contienen mucha DHL₁, se debe evitar el análisis de muestras de suero hemolisadas. En las condiciones hepáticas, la electroforesis de la DHL muestra que la elevación en la DHL total se debe a la liberación de DHL₄ y DHL₅ al suero.

Aspartato aminotransferasa (EC 2.6.1.1) y alanino aminotransferasa (EC 2.6.1.2).

Las transaminasas ASAT y ALAT catalizan la conversión de aspartato y alanina a oxaloacetato y piruvato respectivamente. (Ver en las pags 518 y 533 en la sección de métodos una discusión sobre la medición de las transaminasas). En el hígado se encuentran los niveles más altos de ALAT, mientras que las ASAT se encuentra presente en el corazón músculo esquelético e hígado en cantidades similares. La actividad en el suero de tanto la ASAT como la ALAT aumenta rápidamente durante el comienzo de la ictericia viral y permanece elevada por 1 a 2 semanas. En las hepatitis tóxicas también se elevan la ALAT y la ASAT, pero la DHL se eleva mucho más como resultado de la necrosis celular hepática. En los pacientes con hepatitis crónica activa también se observan aumentos en la ASAT y ALAT.

La necrosis hepática aguda se acompaña por incrementos significativos en las actividades de tanto la ALAT y la ASAT. El aumento en la actividad de la ALAT es generalmente mayor que el incremento en la actividad de la ASAT. En la cirrosis del hígado las actividades de las transaminasas séricas generalmente no se elevan por encima de 300 U/L, sin importar la causa de la enfermedad cirrótica. Las elevaciones en las ALAT y ASAT séricas observadas en el síndrome de Reye, son atribuibles directamente al daño hepático, y el incremento en la ALAT es generalmente mayor que el incremento en la ASAT. También se incrementa la actividad de las transaminasas en la actividad neoplásica.

En el diagnóstico de la enfermedad del hígado, la medición de los niveles séricos de ASAT y ALAT es valiosa. Sin embargo, la mejor manera de usar estos análisis es junto con otros análisis de enzimas como la DHL y la creatina cinasa, y con otras mediciones de la función renal y hepática como la urea sanguínea, la creatinina, el amoníaco y la bilirrubina.^{ref(647)} Esto es importante cuando se establece el diagnóstico puesto que la ALAT y la ASAT están presentes en otros tejidos además del hígado y la actividad sérica de estas enzimas puede reflejar una enfermedad orgánica en tejidos distintos al hígado. Las actividades séricas de la ALAT y la ASAT se elevan en el infarto del miocardio, infarto renal, distrofia muscular progresiva y otro gran número de enfermedades que solamente afectan al hígado de



una manera secundaria, como la enfermedad de Gaucher, la enfermedad de Niemann-Pick, la mononucleosis infecciosa, la leucemia mielocítica, la cetoacidosis diabética y el hipertiroidismo.

Otros compuestos analizados para hígado

Bilirrubina (ver capítulo 35).

El análisis de la bilirrubina sérica es útil para diferenciar la causa de la ictericia. La *ictericia prehepática* es el resultado de un incremento grande de la bilirrubina no conjugada debido a la liberación y el metabolismo aumentado de la hemoglobina después de la hemólisis. Se observa un incremento nulo o moderado en la bilirrubina conjugada debido a que el transporte de la bilirrubina al hígado y la formación del conjugado con el glucorónido limitan el proceso. Adicionalmente, debido a los niveles de bilirrubina conjugada que son excretados por el hígado, se elevan las concentraciones de urobilinógeno urinario y urobilina fecal, pero la bilirrubina urinaria (la cual es únicamente la forma conjugada libremente soluble) está ausente. En contraste la *ictericia posthepática obstructiva* se caracteriza por grandes aumentos en la bilirrubina conjugada sérica. La bilirrubina delta, bilirrubina unida covalentemente a la albúmina, también se eleva en este desorden. La medición de la bilirrubina delta, como prueba diagnóstica no ha logrado una aceptación generalizada. La acumulación de la bilirrubina en el suero se produce como consecuencia de una excreción biliar disminuida después de la conjugación de la bilirrubina, más que por una carga aumentada de bilirrubina causada por hemólisis. La excreción hepática de los metabolitos de la bilirrubina es baja y se puede evidenciar usualmente la bilirrubina urinaria. La *ictericia hepática* presenta un patrón intermedio en las cuales las bilirrubinas séricas conjugadas y no conjugadas se incrementan al mismo grado y la bilirrubina conjugada se presenta en la orina. Sin embargo la concentración fecal de urobilina está disminuida (ver pág. 523 para los métodos).

Colesterol.

El colesterol sérico está compuesto de dos formas: el colesterol libre y el esterificado. Puesto que la esterificación se realiza en el hígado la enfermedad intrahepática o la obstrucción biliar se caracterizan por un incremento del colesterol libre y ocasionalmente por un desplazamiento en el perfil de ácidos grasos libres del suero, aunque el colesterol total permanece usualmente sin modificar. El colesterol total puede disminuir hasta valores inferiores al rango de referencia en la enfermedad crónica asociada con la destrucción del parénquima celular.

Ácidos biliares.

En la enfermedad se altera la secreción y producción de ácidos biliares.^{ref(648)} El suero contiene 1 a 2 µg/mL de ácidos biliares en el adulto sano. En la enfermedad hepatobiliar, las concentraciones de ácidos biliares séricos se pueden elevar hasta 1000 veces. También se pueden elevar significativamente en otras enfermedades como hepatitis, cirrosis, enfermedad hepática inducida por drogas y el hepatoma. Las concentraciones de ácidos biliares séricos se encuentran normales en la enfermedad de Gilbert, la hemocromatosis y la enfermedad poliquística del hígado. La medición de los ácidos biliares es útil para el diagnóstico de la disfunción hepática mínima cuando los otros parámetros aun están sin modificar.

Triglicéridos.

Los triglicéridos séricos se deben medir en una muestra en ayunas. Los incrementos son relativamente inespecíficos; [ref\(649\)](#) la disfunción hepática causada por hepatitis, obstrucción biliar extrahepática y cirrosis se asocia con un incremento en los triglicéridos séricos, pero así sucede también en enfermedades como la pancreatitis aguda, infarto del miocardio, falla renal, gota, anemia perniciosa y diabetes mellitus. Los ácidos grasos libres también son no específicos. Están disminuidos en la hepatitis crónica, la falla renal crónica y la fibrosis quística. Las concentraciones de ácidos grasos libres se elevan en el síndrome de Reye, la encefalopatía hepática y la hepatitis crónica activa, pero también en el infarto del miocardio, la falla renal aguda, el hipertiroidismo y el feocromocitoma.

Proteínas séricas en la evaluación de la función hepática.

Se requiere un hígado sano en plenas funciones para la síntesis de las proteínas séricas, excepto las gamma globulinas. El hígado tiene la capacidad de duplicar la producción y salida de proteínas durante las enfermedades asociadas con pérdida de proteínas. En consecuencia, no debe sorprender que las mediciones de proteínas totales no se alteren sino hasta que haya ocurrido una disminución extensiva de la función hepática.

La albúmina (ver pag 518 sección métodos) se disminuye en la enfermedad hepática crónica y generalmente se acompaña por un incremento en las globulinas beta y gamma, debido a la producción de IgG e IgM en la hepatitis crónica activa y de la IgM e IgA en la cirrosis biliar o alcohólica respectivamente. Se debe hacer énfasis en que estas inmunoglobulinas no son producidas en el hígado sino por las células plasmáticas del sistema reticuloendotelial. Se puede facilitar la identificación de estas subclases de gamma globulinas mediante la inmunolectroforesis. Sin embargo, una disminución en la albúmina sérica no es específica para la enfermedad hepática puesto que la albúmina también disminuye en la malabsorción, la desnutrición, la enfermedad renal, el alcoholismo y las enfermedades malignas.

La fracción alfa₁ de las globulinas séricas se disminuye en la enfermedad hepática crónica y cuando esta fracción está ausente, o casi, indica que una deficiencia en la alfa₁-antitripsina puede ser la causa de la enfermedad hepática. Las proteínas séricas, globulina alfa₂ y beta se aumentan en la ictericia obstructiva. Este incremento en la alfa₂-globulina y la beta globulina en la ictericia obstructiva está asociada con interferencias en el metabolismo normal de las lipoproteínas. Por consiguiente, no se puede hacer claramente el fenotipo de un desorden lipídico en presencia de enfermedad hepática. El uso del colesterol de alta densidad para evaluar el riesgo de la enfermedad coronaria se obvia en los pacientes con enfermedad hepática alcohólica, obstrucción biliar y necrosis hepática aguda.

El hígado produce los factores de coagulación y estos pueden disminuir significativamente en la presencia de enfermedad hepática. El fibrinógeno plasmático está presente normalmente en una concentración de 2 a 4 g/L. Una disminución en el fibrinógeno plasmático indica una enfermedad hepática severa y está asociada con concentraciones disminuidas de otros factores de coagulación, especialmente la protrombina. Puesto que la síntesis de la protrombina ocurre en el hígado, y requiere de la vitamina liposoluble K, se puede incrementar el tiempo de protrombina, en la enfermedad obstructiva biliar, la cirrosis o necrosis hepática, la falla hepática, el síndrome de Reye, los abscesos hepáticos, la deficiencia



de vitamina K y la hepatitis. Se puede diferenciar la enfermedad intrahepática asociada con una disminución en el factor de coagulación, de la enfermedad obstructiva intrahepática con una absorción disminuida de vitamina K, observando la respuesta del tiempo de protrombina a la administración exógena de vitamina K.

Urea y amoníaco en la evaluación de la función hepática.

La concentración sanguínea de amoníaco es superior en los infantes que en los adultos, debido a que el desarrollo de la circulación hepática se termina después del nacimiento. La hiperamonemia es una entidad que resulta poco frecuentemente debido a defectos congénitos en el ciclo de la urea. El error innato del metabolismo más común es la deficiencia en ornitina transcarbamilasa. La hiperalimentación es una causa mucho más frecuente de hiperamonemia en infantes.^{ref(650)} Con frecuencia, se diagnostica el síndrome de Reye por un amoníaco sanguíneo elevado en ausencia de otra causa demostrable.

Los pacientes adultos muestran concentraciones elevadas de amoníaco sanguíneo en las etapas terminales de la cirrosis hepática, la falla hepática, y la necrosis del hígado aguda y subaguda. Se presagia el comienzo de la encefalopatía hepática por una elevación en el amoníaco sanguíneo. Se ha demostrado que la medición en líquido cefalorraquídeo (LCR) de la glutamina, correlaciona bien con el desarrollo de la encefalopatía hepática. También se puede usar la medición de la glutamina en el LCR, para diferenciar la encefalopatía hepática de la séptica.^{ref(651)} Sin embargo, no es común la medición de la glutamina en el LCR. La excreción de amoníaco urinario se eleva en la acidosis y se disminuye en la alcalosis, puesto que la formación de sales de amonio es un mecanismo importante para excretar el exceso de iones hidrógeno. Daños en los túbulos renales distales, tal como ocurre en la falla renal, la glomerulonefritis, el hipercorticismismo y la enfermedad de Addison, conllevan a una excreción de amoníaco disminuida sin presentar cambios en los niveles sanguíneos de amoníaco.

Puesto que la urea se sintetiza en el hígado, se presenta nitrógeno ureico sérico bajo, en la enfermedad hepática sin daño en la función renal, aunque la relación urea a creatinina se puede conservar normal.^{ref(652)} La elevación en el nitrógeno ureico sérico no implica necesariamente daño renal, puesto que la deshidratación puede llevar a concentraciones de nitrógeno ureico tan altas como 600 mg/L, y los infantes que reciben una fórmula alta en proteínas pueden tener niveles de nitrógeno ureico de 250 a 300 mg/L. Naturalmente, enfermedades como la glomerulonefritis aguda, la nefritis crónica, el riñón poliquístico y la necrosis renal elevan el nitrógeno ureico.

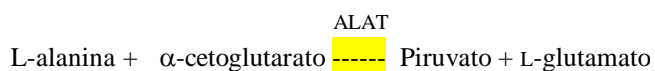
Métodos de Análisis

Alanina aminotransferasa

Steven C. Kazmierczak

Principios de análisis y uso corriente .

La alanina aminotransferasa cataliza la transferencia del grupo amino entre los aminoácidos L-alanina y L-glutamato. Los cetoácidos formados en el proceso son el α -cetoglutarato y el piruvato tal como se ve a continuación:



Los primeros métodos para el análisis de la ALAT, utilizaban la capacidad del piruvato, formado en la reacción anterior, para reaccionar con dinitrofenilhidrazina (DNFH) para producir la hidrazona correspondiente (Tabla 27-5, método 1).^{ref(653)} La alcalinización de la mezcla resultante produce la formación de un color azul que se puede medir a 505 nm. El α -cetoglutarato puede reaccionar también con la DNFH para formar la hidrazona correspondiente. Sin embargo, la cantidad de color producido es despreciable y se ignora generalmente.^{ref(654)} Este procedimiento presenta un problema consistente en que el piruvato, presente normalmente en el suero también reacciona para producir hidrazonas, provocando lecturas iniciales de absorbancia altas; este método ya se considera obsoleto.

Los métodos en uso más comunes para la medición de la ALAT son métodos de monitoreo continuo. Estos métodos acoplan la producción de piruvato en la reacción catalizada por la ALAT a una segunda reacción mediante la cual el piruvato es reducido por la NADH en una reacción catalizada por la deshidrogenasa láctica (DHL) (Tabla 27-5, método 2).^{ref(655)} La desaparición de la NADH debido a su oxidación a NAD se monitorea a 340 nm. En los métodos de monitoreo continuo, la etapa que limita la velocidad es la reacción catalizada por la ALAT, puesto que el α -cetoglutarato, la L-alanina, NADH, y la enzima indicadora DHL, se encuentran en una cantidad excesiva.

La ALAT requiere una coenzima para poder tener su actividad catalítica total. El cofactor piridoxal 5'-fosfato (P-5'-F) se une a la apoenzima donde su función es aceptar el grupo amino proveniente del sustrato alanina. El P-5'-F (vitamina B₆) toma el grupo amino de la alanina y forma la piridoxamina-5'-fosfato, unida a la enzima, y piruvato. El complejo enzima-piridoxamina-5'-fosfato transfiere después el grupo amino al α -cetoglutarato para formar L-glutamato y regenerar el P-5'-F tal como se ve a continuación:

1. L-alanina + complejo enzima-piridoxal-5'-fosfato → complejo enzima-piridoxamina-5'-fosfato + Piruvato
2. α -Cetoglutarato + complejo enzima-piridoxamina-5'-fosfato → complejo enzima-piridoxal-5'-fosfato + L-glutamato

Puesto que la coenzima puede no estar en suficiente cantidad en el suero para producir la actividad máxima de la enzima, algunos sistemas de reactivos adicionan la coenzima P-5'-F para medir la actividad de la ALAT.

Muestra.

Aunque para medir la actividad de la ALAT se puede usar tanto el suero como el plasma, se prefiere como muestra el suero. Los plasmas que hayan sido anticoagulados con oxalato, heparina o citrato pueden producir turbidez en la muestra. Puesto que los eritrocitos contienen 3 a 5 veces más ALAT que la sangre normal, no se pueden aceptar muestras hemolisadas. La muestra es estable hasta por 24 horas entre 20° y 25° C y hasta por 7 días si se refrigera de 2° a 8° C.^{ref(656)}



Intervalo de referencia.

La medición de la ALAT en adultos a 37° C usando reactivos que usan P-5'-F, da usualmente actividades de 10 a 50 U/L. Tanto los recién nacidos como los infantes tienen actividades en el suero que son dos a tres veces las encontradas en los sueros adultos. La actividad mayor en el suero de los recién nacidos e infantes se puede atribuir a la filtración de la enzima a través de la membrana del hepatocito la cual es más permeable en los recién nacidos e infantes.

Albúmina

Kee Cheung

Peter E. Hickman

Principios de análisis y uso corriente.

La medición de las concentraciones de albúmina en suero y otros líquidos corporales es una prueba de laboratorio muy común, útil para la evaluación del estado nutricional así como indicador de la función hepática, y en la orina para monitorizar la pérdida de la función renal. La albúmina posee algunas características únicas cuando se compara con otras proteínas del suero, y esas características son la base para su medición. Dos de estas características únicas son su bajo contenido en el aminoácido triptófano y el hallazgo que la albúmina existe como un anión a pH 7.4.[ref\(657\)](#)

Uno de los métodos de análisis utiliza la diferencia entre el contenido de triptófano de esta proteína (0.2%) y el mayor contenido (2% a 3%) encontrado en las fracciones globulínicas.[ref\(658\)](#) La concentración de albúmina se obtiene al restar la concentración de globulina presente en la muestra de la concentración de proteínas totales. Como ejemplo de uno de estos métodos basados en la determinación del contenido de triptófano es aquel que usa ácido glioxílico (Tabla 27-6, método 1). En presencia de Ca⁺⁺, y en medio ácido, el ácido glioxílico reacciona con los residuos de triptófano para producir un color púrpura.[ref\(659\)](#) Se puede compensar la interferencia debida a la albúmina mediante la estandarización del análisis con suero. Aunque ha sido posible automatizar el método para usarlo rutinariamente, se usan con muy poca frecuencia los métodos para la determinación de albúmina basados en la determinación del contenido de triptófano debido a que los métodos basados en la unión con colorantes son más fáciles y más específicos.

Los métodos más comunes actualmente en uso para la determinación de las concentraciones de albúmina en suero son procedimientos con unión a colorantes (Tabla 27-6, método 2). Estos métodos se basan en la capacidad de la albúmina de unirse a una gran variedad de iones orgánicos incluyendo moléculas de colorante. Los colorantes más usados para la determinación de albúmina son el verde de bromocresol (3',3'',5',5''-tetrabromo-*m*-cresolsulfonftaleína, VBC) o el púrpura de bromocresol (5',5''-dibromo-*o*-cresolsulfonftaleína, PBC). Cuando estos colorantes se unen a la albúmina, cambian su máximo de absorción. Este desplazamiento en los máximos de absorción permite la medición del colorante unido a la albúmina, en presencia de colorante en exceso sin unir en la mezcla reactiva. Los métodos de unión a reactivos también han podido ser adaptados para ser usados mediante la tecnología de película seca. El colorante verde de bromocresol es incorporado a la capa de reactivo junto con una solución tampón y surfactantes. El suero o el

plasma se aplica en la capa superior de la placa donde se distribuye uniformemente antes de difundir a la capa de reactivo donde reacciona con el VBC. La cantidad de colorante unido a la albúmina es proporcional a la albúmina en la muestra y se mide mediante espectrofotometría de reflectancia.

Los métodos que usan el VBC son bastante específicos para la albúmina, sin que tengan interferencia por la bilirrubina y con una interferencia de ligera a moderada por la lipemia. La hemoglobina interfiere con la unión del VBC a la albúmina y provoca un descenso en la albúmina de 1 g/L por cada 100g/L de hemoglobina presente. La especificidad del procedimiento del VBC se mejora por la medición de la absorbancia del complejo VBC-albúmina poco después de mezclar la muestra y el reactivo de VBC.^{ref(660)} Las lecturas que se toman poco tiempo después de mezclar eliminan la interferencia debida a otras proteínas como la ceruloplasmina y el orosomucoide, las cuales también se unen a al VBC, pero cuya unión no ocurre de manera apreciable hasta 5 minutos después de iniciar el análisis.

Aunque tanto el VBC como el PBC se usan comúnmente en los métodos de unión con colorantes, el VBC ofrece ciertas ventajas sobre el PBC. La absorptividad molar del complejo albúmina-PBC es aproximadamente la mitad de la observada para el complejo albúmina-VBC. Como resultado la sensibilidad y la precisión de los métodos con PBC son mucho menores que para los métodos que usan VBC. Otra desventaja de los métodos que emplean PBC es el hallazgo de que las concentraciones de albúmina de los pacientes con insuficiencia renal^{ref(661)} o ictericia obstructiva son subestimadas.^{ref(662)} Finalmente, los métodos con PBC no son adecuados para el uso con muestras de origen no humano debido a que el PBC se une con mucho menos afinidad a la albúmina no humana. El método más común para monitorizar la presencia de albúmina en orina usa un método de desplazamiento de colorante (Tabla 27-6, método 2c). Esta es la base de las tiras urinarias.

Aunque los métodos de enlace de colorantes se usan frecuentemente para determinar las concentraciones de albúmina en suero o plasma, esta técnica tiene poca aplicación para la medición de albúmina en otros líquidos corporales como orina o líquido cefaloraquídeo debido a las concentraciones tan bajas de albúmina que normalmente se encuentran en estas muestras y a la alta concentración de sustancias que pueden estar presentes. La medición de concentraciones de albúmina en los líquidos diferentes al suero o plasma se realiza corrientemente mediante métodos alternativos como la electroforesis o los métodos inmunoquímicos.

La separación mediante técnicas electroforéticas de la albúmina de las otras proteínas principales (Tabla 27-6, método 3), es un método usado tanto para la determinación en suero como otros líquidos corporales. Después de separar las clases principales de proteínas por electroforesis, se colorean las diferentes fracciones proteicas y se determina el porcentaje de cada fracción usando un densitómetro (ver capítulo 10 para obtener información adicional sobre electroforesis de proteínas). Se calcula la concentración de albúmina multiplicando la concentración de proteínas totales presentes en la muestra por el porcentaje de albúmina presente de acuerdo a la determinación por el densitómetro. Los colorantes que pueden ser usados para colorear las fracciones proteicas tienen afinidades diferentes en su interacción con las fracciones proteicas. Puesto que la albúmina posee la mayor afinidad por estos colorantes, los procedimientos electroforéticos sobrestimarán la concentración de albúmina debido a su mayor afinidad por los colorantes cuando se compara a las de las otras fracciones proteicas.

El método inmunológico es una técnica más común para cuantificar la albúmina en

líquidos como el líquido cefaloraquídeo y la orina. Las técnicas inmunológicas usadas para cuantificar la albúmina incluyen tanto las técnicas inmunonefelométricas como las inmunturbidimétricas, el radioinmunoanálisis (RIA), los análisis inmunosorbentes ligados a enzimas (ELISA), la inmunodifusión radial (IDR) y la electroinmunodifusión (EID).

Las técnicas inmunonefelométricas^{ref(663)} e inmunturbidimétricas^{ref(664)} (Tabla 27-6, métodos 4a y 4b) son los métodos inmunológicos más comunes en uso para cuantificar la albúmina en LCR y orina. Estos métodos se basan en la capacidad de un complejo albúmina-anticuerpo antialbúmina ya sea para bloquear (turbidimetría) o dispersar (nefelometría) un rayo de luz dirigido contra la muestra. La cantidad de luz que es bloqueada o dispersada se relaciona con la concentración de albúmina en la muestra por comparación con soluciones patrón a las que se les conoce la concentración de albúmina.

Se han desarrollado procedimientos de RIA sensibles y específicos (Tabla 27-6, método 4c) para la determinación de albúmina en orina, con el fin de ayudar a monitorizar el progreso de la nefropatía diabética.^{ref(665)} Los métodos ELISA (Tabla 27-6, método 4d) se basan en la formación de un “sandwich” entre un anticuerpo ligado a una superficie sólida, albúmina y un segundo anticuerpo conjugado a una enzima.^{refs(666)} La adición final de sustrato al sistema provoca el desarrollo de un producto coloreado que es proporcional a la concentración de albúmina en la muestra.

La cuantificación de albúmina usando IDR o EID se realiza de manera muy infrecuente en los laboratorios clínicos debido a la naturaleza técnica de los procedimientos. En la IDR, la albúmina difunde pasivamente a través de un gel de agar que contiene anticuerpos.^{ref(667)} La concentración de albúmina en la muestra se determina midiendo la distancia que la albúmina debe recorrer antes de alcanzar el equilibrio. El equilibrio del sistema se define como el área en el gel donde los complejos albúmina-anticuerpo precipitan debido a la presencia de anticuerpo en exceso. Se colorea el complejo albúmina-anticuerpo que precipita con un colorante adecuado. El diámetro del anillo coloreado de los complejos albúmina-anticuerpo es proporcional a la concentración de albúmina en la muestra.

Muestra.

La mejor muestra para la determinación de albúmina es el suero. El uso del plasma heparinizado puede provocar la sobre estimación de las concentraciones de albúmina con algunos métodos que usan la unión con VBC.^{ref(668)} La heparina también puede producir una interferencia en los métodos basados en la unión con el PBC; sin embargo, se puede eliminar la interferencia adicionando bromuro de hexadimetrina al reactivo.^{ref(669)}

La lipemia pronunciada también puede producir interferencia en los análisis que usan el VBC como reactivo; una muestra en ayunas puede ser deseable. Se puede producir un aumento aparente en la concentración de albúmina, al igual que en otras proteínas plasmáticas, debido a la hemoconcentración producida por la venostasis.

Es muy controversial la forma más adecuada de almacenar las muestras de orina recogidas para realizar la medición de albúmina. Estudios recientes sugieren que el almacenamiento de las muestras de orina a -70° C debería ser adecuada para prevenir pérdidas en la concentración de albúmina en por lo menos 160 días.^{ref(670)}

Las concentraciones de albúmina en el suero dependen del sexo y la edad, tal como se muestra a continuación.^{ref(671)} Se presentan valores más bajos en niños y recién nacidos en comparación a los adultos.^{ref(672)} Adicionalmente, los niños prematuros tienen valores más



bajos que los niños a término.[ref\(673\)](#)

La postura afecta las concentraciones de albúmina; los valores son aproximadamente más bajos en 5g/L en los pacientes acostados comparados a los valores obtenidos de pacientes ambulatorios.[ref\(674\)](#)

Las concentraciones de albúmina en orina de los individuos sanos son menores a 15 a 30 mg/L. Valores de albúmina en orina que superen consistentemente estos valores se deben interpretar como anormales.[ref\(675\)](#)

Intervalo de referencia.

EDAD	ALBUMINA (g/L)
Infantes	29-55
Niños	38-55
21-44 años	33-61 (hombres)
20-44	28-57 (mujeres)
45-54 años	29-61 (hombres)
45-54 años	25-54 (mujeres)
55-93 años	32-55 (hombres)
55-81 años	32-53 (mujeres)

Fosfatasa alcalina

Julie Raymond-Habecker

John A. Lott

Principio del análisis.

Las fosfatasas son una familia de enzimas que transfieren una porción fosfato de un compuesto donante a un compuesto aceptor. Se desconoce el sustrato natural in vivo para la ALP, sin embargo, muchos ésteres de fosfato no fisiológicos pueden servir de sustrato. Las fosfatasas con una actividad óptima a pH alcalino son conocidas colectivamente como “fosfatasa alcalina”. Para una actividad óptima estas enzimas requieren iones Mg^{++} y Zn^{++} y un pH de aproximadamente 10.0. El Ca^{++} y el fosfato inorgánico inhiben la actividad de la ALP.

La ALP humana consta de por lo menos cinco isoenzimas específicas de tejido fuera de encontrarse enzimas adicionales asociadas con ciertas enfermedades benignas y malignas. Las enzimas individuales exhiben propiedades catalíticas y físicas diferentes. Las velocidades de reacción dependen de variables como el tipo de sustrato y solución tampón que se usen, y la temperatura de incubación. Puesto que la ALP se desnaturaliza lentamente a 37° C, se recomienda con frecuencia una temperatura de reacción de 25° C a 30° C para los análisis clínicos. Los métodos usados para la determinación de la actividad de la ALP son generalmente un compromiso con el fin de obtener un sesgo mínimo para cada una de las isoenzimas.

Es crítica la escogencia de la solución tampón. Las soluciones tampón sugeridas incluyen la dietanolamina (DEA) y el 2-amino-2-metil-propanol (AMP). Se deben considerar ciertas desventajas tanto para la DEA como el AMP. Se ha encontrado que las preparaciones con DEA contienen cantidades significativas de monoetanolamina, un inhibidor potente de la



ALP, mientras que el AMP contiene compuestos inhibidores de la ALP, al unirse con los iones Zn^{++} . Se ha propuesto recientemente el uso de una solución tampón con N-metil-D-glucamina, para el análisis de la ALP, pues se encuentra libre de compuestos inhibidores. [ref\(676\)](#)

Los métodos históricos para la medición de la ALP total, medían la liberación de fosfato inorgánico de sustratos como el β -glicerofosfato (Tabla 27-7, método 1) y fenil fosfato (Tabla 27-7, métodos 2 y 3). Estos métodos eran relativamente insensibles y laboriosos.

Los métodos modernos para el análisis de la ALP se basan en los principios establecidos por Bessey y asociados (Tabla 27-7, método 4). Este método usa el *p*NPP (*para*-nitrofenilfosfato) incoloro como sustrato, el cual es hidrolizado por la ALP para formar una sal amarilla el *p*NP (*para*-nitrofenol). Este análisis se puede realizar como un análisis cinético, o se puede emplear una corrección del fondo con la adición de un ácido a la mezcla de reacción después de terminar. El ácido convierte la sal amarilla de sodio en nitrofenol libre, el cual es incoloro, haciéndose posteriormente una segunda lectura de absorbancia.

Se ha descrito también un análisis espectrofotométrico rápido y continuo que ofrece la conveniencia de realizar la medición a 340 nm (Tabla 27-7, método 5). Este método usa el α -naftilfosfato como sustrato, produciendo α -naftol como producto de hidrólisis.

Se ha propuesto un análisis fluorométrico para la ALP, altamente sensible, usando 4-metilumbeliferilfosfato como sustrato (Tabla 27-7, método 6). La ALP hidroliza el sustrato para producir 4-metilumbeliferona, un compuesto altamente fluorescente.

Se han propuesto varios métodos de referencia para medir la actividad de la ALP. Estos métodos representan la culminación de los experimentos diseñados para seleccionar las condiciones óptimas de pH, temperatura, tipo de solución tampón y concentración de reactivos. El método con *p*NPP de Bowers y McComb (Tabla 27-7, método 7), usando AMP como solución tampón, se usa mucho hoy en día por su simplicidad y sensibilidad. Se debe resolver todavía la controversia referente a las condiciones óptimas para medir la actividad de la ALP, y se debe establecer un método de referencia universalmente aceptado.

Muestra.

Son preferibles las muestras de sangre después de un ayuno de 8 horas. El suero y el plasma heparinizado dan resultados comparables. Se deben evitar los anticoagulantes complejantes como el citrato, el oxalato y el EDTA que se unen al Mg^{++} y el Zn^{++} , para la recolección de sangre en el análisis de la ALP. Se puede aceptar la hemólisis ligera, pero no se deben usar las muestras altamente hemolisadas. No se presenta interferencia por la bilirrubina en los análisis cinéticos que usan *p*NPP.

Las condiciones de almacenamiento de sangre pueden afectar negativamente la actividad de la ALP. Se han observado incrementos ligeros en la actividad de la ALP (1% a 2%) en las muestras guardadas a temperatura ambiente por 4 horas después de haber sido recogidas. [ref\(677\)](#) Se observan incrementos significativos después de calentar el suero refrigerado o congelado. Un efecto similar se observa después de reconstituir el suero liofilizado. El fenómeno ha sido atribuido a la disociación de los complejos formados entre la ALP y las lipoproteínas a temperaturas bajas o durante la liofilización, provocando un incremento aparente en la actividad enzimática.

Intervalo de referencia.

Se desarrollaron los siguientes intervalos de referencia usando un método cinético con *p*-NFF:

MUJERES (Edad en años)	F. alc. (hasta en U/L)	HOMBRES (Edad en años)	F. alc. (hasta en U/L)
Recién nacidos	250	Recién nacidos	250
1 a 12	350	1 a 12	350
10 a 14	280	10 a 14	275
15 a 19	150	15 a 19	155
20 a 24	85	20 a 24	90
25 a 34	85	25 a 34	95
35 a 44	95	35 a 44	105
45 a 54	100	45 a 54	120
55 a 64	110	55 a 64	135
65 a 74	145	65 a 74	140
75+	165	75+	190

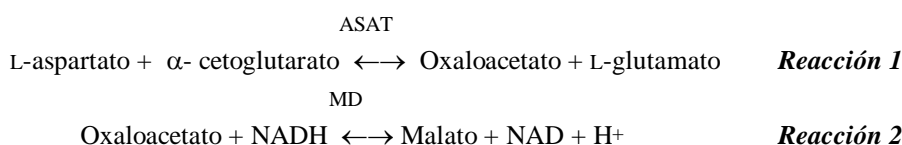
Entre los factores no relacionados con la enfermedad que pueden provocar una elevación en los niveles de F. alc sérica se incluyen el ejercicio, períodos de crecimiento óseo rápido en niños pre-púberes y el embarazo.

Aspartato aminotransferasa

Steven C. Kazmierczak

Principio de análisis.

La aspartato aminotransferasa cataliza la interconversión de los aminoácidos L-aspartato y L-glutamato a través de la transferencia de grupos amino. El esquema general de la reacción catalizada por la ASAT se muestra en la reacción 1:



Aunque el equilibrio en el pH fisiológico de la reacción de la ASAT favorece la formación de aspartato, in vivo, la reacción se inclina a la derecha para producir glutamato con el fin de que sirva de fuente de nitrógeno en el ciclo de la urea.

Los primeros métodos para el análisis de la ASAT utilizaban la reacción del oxaloacetato con la 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNFH) para producir la hidrazona de color azul (Tabla 27-8, método 1).^{ref(678)} Se detiene la reacción agregando DNFH la cual reacciona con el oxaloacetato para formar un complejo oxaloacetato- dintrofenilhidrazona. La alcalinización de la mezcla de reacción le da al complejo un color azul que se mide a 505 nm. Aunque este método se uso con mucha frecuencia ha sido reemplazado por los métodos enzimáticos para la



ASAT y es únicamente de valor histórico.

La determinación enzimática de la ASAT usa también la formación de oxaloacetato como medio para cuantificar la actividad de la enzima (Tabla 27-8, método 2).^{ref(679)} En este procedimiento el oxalato producido por la acción de la ASAT en la reacción 1 es reducido a malato por la enzima malato deshidrogenasa en una reacción indicadora (reacción 2). En este proceso se monitoriza la oxidación de NADH a NAD⁺ a 340 nm. La mayoría de los laboratorios, hoy en día, usan el método de Karmen para las determinaciones de ASAT. Esto, debido a su simpleza, especificidad, facilidad de automatizar y rápido tiempo de análisis.

Algunos fabricantes incluyen fosfato de piridoxal (F-5'-P) como cofactor para la ASAT en el reactivo. No se ha clarificado la necesidad de añadir este cofactor al reactivo de la ASAT. Normalmente, el suero contiene cantidades adecuadas de F-5'-P (vitamina B₆) y, por tanto, la inclusión de este cofactor en el reactivo para la ASAT no es esencial. Sin embargo los individuos que son vitamina B₆ deficientes, como los abusadores crónicos de alcohol pueden mostrar concentraciones de ASAT anormalmente bajas. La adición del F-5'-P produce una elevación en la actividad medida de la ASAT hasta en un 50%.^{ref(680)}

También se encuentra disponible un método colorimétrico para la ASAT. Este método se emplea en un análisis de capa seca para la ASAT (Tabla 27-8, método 3) y usa dos reacciones acopladas, y una reacción final indicadora. En esta reacción, el oxaloacetato formado por desimantación del L-aspartato es convertido en piruvato y dióxido de carbono por la oxaloacetato decarboxilasa. Después se oxida el piruvato mediante la piruvato oxidasa a acetil fosfato y peróxido de hidrógeno. La reacción final indicadora implica la oxidación de un leucocolorante por la peroxidasa para producir un colorante coloreado. Aquellas muestras que contienen concentraciones elevadas de piruvato, consumirán el sustrato muy rápidamente y deberán ser diluidas. Estos análisis de capa fina también pueden tener interferencias por la presencia de concentraciones elevadas de proteínas, como se presenta en los pacientes de mieloma múltiple.^{ref(681)}

Muestra.

Son muestras aceptables para los procedimientos que usan MDH, el suero o el plasma anticoagulado con heparina, oxalato, EDTA o citrato.^{ref(682)} Para el método colorimétrico de capa fina, solo se pueden usar suero o plasma heparinizado. Se deben evitar anticoagulantes con sal de amonio (como, por ejemplo la heparina de amonio). Puesto que los eritrocitos contienen aproximadamente 15 veces la cantidad de ASAT del suero normal, las muestras hemolisadas son inadecuadas para el análisis.

Intervalos de referencia.

En los adultos, los intervalos normales de referencia para la ASAT en suero o plasma son de 5 a 34 U/L cuando el análisis se realiza a 37° C. En los recién nacidos e infantes, las actividades enzimáticas son aproximadamente el doble de las encontradas en los adultos. Aproximadamente a los seis meses, las actividades enzimáticas de este grupo se acercan a las encontradas en los adultos.^{ref(683)}

Bilirrubina Total

Steven C. Kazmierczak



Principios de análisis y uso corriente.

Tal como se describió anteriormente, la bilirrubina se presenta en tres formas: no conjugada, conjugada y unida covalentemente a la albúmina. Estas tres formas tienen solubilidades en agua distintas, y, por tanto, capacidades distintas para reaccionar químicamente. La bilirrubina no conjugada tiene una solubilidad en agua muy limitada, mientras que las otras dos fracciones son mucho más solubles. Las propiedades de solubilidad de las fracciones de bilirrubina han afectado tanto como medimos la bilirrubina como la denominación de las fracciones.

Históricamente, se conocía que la bilirrubina sérica reaccionaba mediante una reacción lenta y una reacción rápida, y que la reacción lenta se podía acelerar si se añadía un acelerador a la mezcla de reacción. La fracción de bilirrubina que reaccionaba directa y rápidamente en ausencia de un acelerador era conocida como bilirrubina “directa”, mientras que la fracción que requería el “acelerador” para reaccionar con rapidez era conocida como bilirrubina “indirecta”. Los aceleradores actúan solubilizando la bilirrubina no conjugada y aumentando su disponibilidad para reaccionar.

Sabemos ahora que la bilirrubina “directa” es la bilirrubina conjugada fácilmente soluble y, las fracciones de bilirrubina delta e “indirecta” son la bilirrubina no conjugada. Puesto que todas las fracciones de bilirrubina reaccionan en presencia de un acelerador, esta bilirrubina se conoce como *bilirrubina total*. Al medir la bilirrubina total y la directa se puede calcular la cantidad de bilirrubina no conjugada (o indirecta) por diferencia.

$$\text{Bilirrubina total} - \text{Bilirrubina conjugada} = \text{Bilirrubina no conjugada}$$

Prácticamente todos los métodos usados comúnmente para medir las fracciones de bilirrubina se basan en la reacción de la bilirrubina con alguna sal de diazonio tal como se describe en la Fig. 27-8, para el cloruro de diazonio. Históricamente, la diferencia entre los métodos empleados para la reacción, era el pH. El método de Jendrassik-Grof (Tabla 27-9, método 2), se hace a un pH cerca a la neutralidad, pero la reacción se mide después de alcalinizar la reacción para producir un cromóforo más intenso, que absorbe a 600 nm. El procedimiento de Malloy-Evelyn (Tabla 27-9, método 1) se hacía a un pH de aproximadamente 1, y el color rojo púrpura del producto de la reacción se medía a 560 nm. Las variaciones de estos dos métodos dependían de la sal de diazonio usada en la reacción y en el acelerador usado en la reacción de la bilirrubina total. Se han usado como aceleradores cafeína-benzoato de sodio, metanol, dimetil sulfóxido, urea y detergentes.

La medición de la bilirrubina conjugada en la orina también emplea la reacción de diazonio. Por ejemplo las tiras reactivas vendidas por Miles Ames (Ames Co., Elkart, Ind.) están impregnadas con una sal de 2,4-dicloroanilindiazonio, mientras que el Icotest de Ames usa una sal de *p*-nitrobenzenodiazonio para la reacción. El Icotest (con una sensibilidad de aproximadamente 10 mg/L) es dos a cuatro veces más sensible que la tira reactiva, aunque ambas pruebas están sujetas a presentar resultados falsos positivos debido a un color endógeno.

También existen métodos disponibles para medir la bilirrubina total por espectrofotometría directa (Tabla 27-9, método 3). Los métodos relacionan la absorbancia del suero cerca a 454 nm, directamente a la concentración de bilirrubina. También se pueden usar



medidores de reflectancia para medir transcutáneamente los niveles de bilirrubina en sangre total. En ambos casos se minimiza la interferencia debida a la oxihemoglobina cuando se realizan mediciones a una segunda longitud de onda (540 nm). Los carotinoides interfieren fuertemente en todos los métodos directos limitando su uso a los recién nacidos que no hayan recibido alimentos que contienen estos compuestos. Los resultados obtenidos por los equipos transcutáneos son, sin embargo, menos exactos y consistentes cuando se comparan con los métodos químicos. La estandarización de estos instrumentos se dificulta debido a las diferencias en la pigmentación entre los individuos.

El desarrollo de un procedimiento por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Tabla 27-9, método 4), que permite cuantificar las diferentes fracciones de bilirrubina ha llevado a un entendimiento mejor de la composición de la bilirrubina en la sangre normal. Las mediciones de bilirrubina por HPLC, muestran que el plasma de los individuos sanos contiene muy poco (esto es menos del 5%) de bilirrubina conjugada. Estos hallazgos indican que la mayoría de los métodos diazo sobrestiman la concentración actual de esta fracción. Los resultados más exactos son proporcionados probablemente por aquellos métodos que miden químicamente la bilirrubina y dan una proporción baja (15% o menos) de bilirrubina de reacción directa. La cantidad de bilirrubina de reacción directa de un método diazo particular depende del tiempo y la temperatura de la reacción.

También se han realizado determinaciones de bilirrubina usando la enzima bilirrubina oxidasa (Tabla 27-9, método 5). Se ha demostrado una buena correlación entre las bilirrubinas total y directa cuando se miden por los dos métodos. Este método presenta una gran ventaja consistente en la alta especificidad de la enzima por la bilirrubina. Se han desarrollado técnicas usando la bilirrubina oxidasa para medir tanto la bilirrubina total como la conjugada.[refs\(684\)](#)

Johnson y Johnson emplean la medición de bilirrubina usando la tecnología de película seca, en sus analizadores Ektachem (Tabla 27-9, método 6). La bilirrubina en el suero difunde a través de la película a una capa que contiene un polímero catiónico hidrofóbico que se acompleja con la bilirrubina, provocando un desplazamiento en el espectro de la bilirrubina de 440 a 460 nm. La reacción se monitoriza por espectrofotometría de reflectancia a 455 nm. En uno de los conjuntos de condiciones de reacción, la bilirrubina acomplejada a las proteínas, también llamada bilirrubina delta, no puede reaccionar en la reacción para la bilirrubina total de Johnson y Johnson. En el método Ektachem de Johnson y Johnson la medición de la bilirrubina directa es la suma de la bilirrubina conjugada y delta. La *bilirrubina delta* y directa se pueden calcular por la resta de los resultados.

Muestra.

En el método diazo para medir la bilirrubina total, se pueden usar suero o plasma. Se prefiere el suero para el método de Malloy-Evelyn, debido a que la adición de alcohol puede precipitar proteínas del plasma. La hemólisis puede deprimir falsamente los resultados de la bilirrubina en la mayoría de los análisis debido a un incremento de la absorbancia en el blanco. Las muestras lipémicas pueden dar concentraciones falsamente elevadas de bilirrubina debido a los efectos de la turbidez. La bilirrubina se destruye muy fácilmente por la luz y el calor. Se debe tener cuidado de realizar los análisis de bilirrubina sin exposición a estos factores.

Las determinaciones de bilirrubina conjugada se realizan comúnmente en el suero puesto que la bilirrubina total se puede determinar concomitantemente. También se



consideran aceptables el líquido cefaloraquídeo y la orina para las determinaciones de bilirrubina.

Intervalo de referencia.

Los niveles de bilirrubina total en los adultos sanos son de máximo 15 mg/L (25.7 $\mu\text{mol/L}$) con una mediana de 7.0 mg/L (12 $\mu\text{mol/L}$). La concentración de la mediana se eleva con la pubertad en ambos sexos, cayendo en la tercera década y permaneciendo estable a continuación.

Se encuentran niveles de bilirrubina conjugada de 2 mg/L en los infantes de 1 mes. La bilirrubina conjugada permanece en ese nivel por el resto de la vida.

Referencias

1. Johnson TR: Development of the liver. In Johnson TR, Moore WM, Jefferies SE, editors: *Children are different: developmental physiology*, ed 2, Columbus, 1978, Ross Laboratories.
2. Demers LM: Serum bile acids in health and in hepatobiliary disease. In Demers LM, Shaw LM, editors: *Demers LM: Serum bile acids in health and in hepatobiliary disease*. In Demers LM, Shaw LM, editors: *Evaluation of liver function*, Baltimore, 1978, Urban & Schwarzenberg.
3. Stoner JW: Neonatal jaundice, *Am Fam Physician* 24:226-232, 1981.
4. Doumas BT, Wu FW: The measurement of bilirubin fractions in serum, *Crit Rev Clin Lab Sci* 28:415-445, 1991.
5. Craig JR: Hepatitis delta virus, editorial, *Am J Clin Pathol* 98:552-555, 1992.
6. Jeppson JO, Franzen B, Cox DW, et al: Typing of genetic variants of alpha-1-antitrypsin by electrofocusing, *Clin Chem* 28:219-225, 1982.
7. Ellis G, Goldberg DM, Spooner RJ, Ward AM: Serum enzyme tests in diseases of the liver and biliary tree, *Am J Clin Pathol* 70:248-258, 1978.
8. Friedman RB, Anderson RE, Entine SM, Hirschberg SB: Effects of diseases on clinical laboratory tests, *Clin Chem* 26:1D-476D, 1980.
9. Lloyd-Still JD: Disorders of the liver in childhood. In Demers LM, Shaw LM, editors: *Evaluation of liver function*, Baltimore, 1978, Urban & Schwarzenberg.
10. Nanji AA, Blank D: The serum urea nitrogen/creatinine ratio and liver disease, *Clin Chem* 28:1398-1399, 1982.
11. Ottobrelli A et al: Patterns of delta virus reinfection and disease in liver transplantation, *Gastroenterology* 101:1649-1655, 1991.
12. Todo S, Fung JJ, Tzakis A, et al: One hundred ten consecutive primary orthotopic liver transplants under FK-506 in adults, *Transplant Proc* 23:1397-1402, 1991.
13. Imagawa DK, Millis JM, Olthoff KM, et al: The role of tumor necrosis factor in allograft rejection. I. Evidence that elevated levels of tumor necrosis factor-alpha predict rejection following orthotopic liver transplantation, *Transplantation* 50:219-225, 1990.
14. Schroeder TJ, Gremse DA, Mansour ME, et al: Lidocaine metabolism as an index of liver function in hepatic transplant donors and recipients, *Transplant Proc* 21:2299-2301, 1989.
15. Reitman S, Frankel S: A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases, *Am J Clin Pathol* 28:56-63, 1957.
16. Breaudiere JP, Burtis C, Pasching J, et al: Study of the alanine aminotransferase kinetic assay by response surface methodology, *Clin Chem* 26:1023, 1980.
17. Wroblewski F, LaDue JS: Serum glutamic-pyruvic transaminase in cardiac and hepatic disease, *Proc Soc Exp Biol Med* 91:569-571, 1956.



18. Tietz NW, editor: *Clinical guide to laboratory tests*, ed 2, Philadelphia, 1990, Saunders.
19. Peters T Jr: Serum albumin. In Putnam FW, editor: *The plasma proteins*, New York, 1975, Academic Press, vol 1.
20. Block RJ, Weiss KW, Carroll DB: In Block RJ, Weiss KW, edi-tors: *Amino acid handbook*, Springfield, Ill., 1956, Charles C Thomas.
21. Goldenberg H, Drewes PA: Direct photometric determination of globulin in serum, *Clin Chem* 17:358-362, 1971.
22. Gustafsson JEC: Improved specificity of serum albumin determination and estimation of "acute phase reactants" by use of the bromocresol green reaction, *Clin Chem* 22:616-622, 1976.
23. Maguire GA, Price CP: Bromocresol purple method for serum albumin gives falsely low values in patients with renal insufficiency, *Clin Chim Acta* 155:83-88, 1986.
24. Bush V, Reed RG: Bromocresol purple dye-binding methods underestimate albumin that is carrying covalently bound bilirubin, *Clin Chem* 33:821-823, 1987.
25. Stamp RJ: Measurement of albumin in urine by end-point immunonephelometry, *Ann Clin Biochem* 25:442-443, 1988.
26. Barlow IM, Harrison SP, Sykes MO: Immunoturbidimetric micro-albumin kit adapted to the Technicon RA-1000, *Clin Chem* 34:177-178, 1988.
27. Jury DR, Speed JF, Dunn RJ: Urinary albumin radioimmunoassay using a solid phase second antibody and solid phase iodination, *Clin Chim Acta* 148:63-67, 1979.
28. Puri A, Casburn-Budd R, Eisen V, Slater JDH: Simpler measurement of albumin in urine or plasma, *Clin Chem* 31:1241-1242, 1985.
29. Townsend JC: A competitive immunoenzymatic assay for albumin in urine, *Clin Chem* 32:1372-1374, 1986.
30. Watts GF, Bennett JE, Rowe DJ, et al. Assessment of immunological methods for determining low concentrations of albumin in urine, *Clin Chem* 32:1544-1548, 1986.
31. Hallbach J, Hoffmann GE, Guder WG: Overestimation of albumin in heparinized plasma, *Clin Chem* 37:566-568, 1991.
32. Duggan J, Duggan PF: Albumin by bromocresol green: a case of laboratory conservatism, *Clin Chem* 28:1407-1408, 1982.
33. MacNeil MLW, Mueller PW, Caudill SP, Steinberg KK: Considerations when measuring urinary albumin; precision, substances that may interfere, and conditions for sample storage, *Clin Chem* 37:2120-2123, 1991.
34. Denko CW, Gabriel P: Age and sex-related levels of albumin, ceruloplasmim, α_1 -antitrypsin, α_1 -acid glycoprotein, and transferrin, *Ann Clin Lab Sci* 11:63-68, 1981.
35. Meites S, editor: *Pediatric clinical chemistry*, Washington, D.C., 1977, American Association of Clinical Chemistry, p 20.
36. Zlotkin SH, Casselman CW: Percentile estimates of reference values for total protein and albumin in sera of premature infants (37 weeks of gestation), *Clin Chem* 33:411-413, 1987.
37. Jacobs DS, Kasten BL Jr, Demott WR, Wolfsen WL: *Laboratory test handbook with DRG index*, St. Louis, 1984, Mosby Lexi-comp, pp 32-33.
38. Tietz NW, editor: *Clinical guide to laboratory tests*, Philadelphia, 1983, Saunders.
39. Schmidt E, Henkel E, Klauke R, et al: Proposal for standard methods for the determination of enzyme catalytic concentrations in serum and plasma at 37⁰ C, *J Clin Chem Clin Biochem* 28:805-806, 1990.
40. Bowers GN, McComb RB: Measurement of total alkaline phosphate activity in human serum, *Clin Chem* 21:1988-1995, 1975.
41. Proceedings of the 1992 international symposium on recent developments in alkaline phosphatase research, *Clin Chem* 38:2484-2551, 1992.
42. Reitman S, Frankel S: A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminase, *Am J Clin Pathol* 28:56-63, 1975.



43. Karmen S: A note on the spectrophotometric assay of glutamic oxalacetic transaminase in human blood serum, *J Clin Invest* 34:131-135, 1955.
44. Bruns D, Savory J, Titheradge A, et al: Evaluation of the IFCC-recommended procedure for serum aspartate aminotransferase as modified for use with the centrifugal analyzer, *Clin Chem* 27:156-159, 1981.
45. Tang M, Sullivan M, Gibson D, Truskolawski C: Kinetic error on Kodak Ektachem: a clue in diagnosis of myeloma, *Clin Chem* 40:166, 1994.
46. Demetriou JA, Drewes PA, Gin JN: Enzymes. In Henry RJ, Cannon DC, Winkelman JE, editors: *Clinical chemistry: principles and technics*, ed 2, Hagerstown, Md., 1974, Harper & Rowe.
47. Meites S, editor: *Pediatric clinical chemistry*, Washington, D.C., 1981, American Association for Clinical Chemistry.
48. Mullon CJ, Langer R: Determination of conjugated and total bilirubin in serum neonates, with use of bilirubin oxidase, *Clin Chem* 33:1822-1825, 1987.
49. Doumas BT, Perry B, Jendrzczak B, Davis L: Measurement of direct bilirubin by use of bilirubin oxidase, *Clin Chem* 33:1349-1353, 1987.

Bibliografía

- Bishop ML, Duben-Engelkirk JL, Fody EP, editors: *Clinical chemistry: principles, procedures, correlations*, ed 2, Philadelphia, 1992, Lippincott.
- Gitnick G: *Hepatology*, New York, 1986, Medical Examination Publishing Co.
- Halsted JA: *The laboratory in clinical chemistry: interpretation and application*, Philadelphia, 1976, Saunders.
- Meites S, editor: *Pediatric clinical chemistry: reference (normal) values*, ed 3, Washington, D.C., 1989, American Association of Clinical Chemists.
- Orton SM, Neuhaus OW: *Human biochemistry*, ed 10, St. Louis, 1982, Mosby.
- Tilton RC, Balows A, Hohnadel DC, Reiss RF, editors: *Clinical laboratory medicine*, St. Louis, 1992, Mosby.

Tablas

Tabla 27-1. Proteínas plasmáticas representativas principales y sus propiedades.

Fracción electroforética	Proteína	Concentración aproximada (g/)	Función Principal
α_1	Transtiretina	0.1- 0.4	Une la proteína fijadora del retinol, T ₄
	Albúmina	40-50	Une el Ca ₂₊ , T ₄ , Bilirrubina
	Antitripsina	2-4	Inhibe algunas enzimas proteolíticas
	Lipoproteína de alta densidad (HDL)	3-8	Transporta el colesterol de los tejidos periféricos al hígado
	Fijadora del retinol	0.03-0.06	Transporte de retinol

α_2	Globulina fijadora de tiroxina (GFT)	0.01- 0.02	Transporte de tiroxina
	Haptoglobinas (tres tipos)	1-3	Transporte de hemoglobina libre de los glóbulos rojos destruidos
	Lipoproteína de muy baja densidad (VLDL)	1.5-2.0	Transporte del colesterol y los triglicéridos
	Ceruloplasmina	0.2-0.6	Transporte del cobre; aumenta el uso del hierro como ferroxidasa
	Protrombina (bovina)	0.1	Proenzima de la trombina
	Angiotensinógeno	–	Precursor de la angiotensina I
	Eritropoyetina	<0.05	Hormona eritropoyética
β_1	Lipoproteína de baja densidad (LDL)	4-10	Transporte del colesterol y otros lípidos
	Plasminógeno	0.3	Profibrinolisisina, precursor de la fibrinolisisina
	Fibrinógeno	3	Factor de coagulación I
$\beta_1\beta_2$	Complemento (C ₄)	0.5-1.8	Lisis de células extrañas
	Transferrina	2-4	Transporte de hierro
β_2	Glicoproteínas	0.3	Desconocido
γ	Globulinas de grupo sanguíneo e inmunoglobulinas	7- 15	Contienen varios anticuerpos, globulinas sanguíneas, complemento C ₁ , C ₂ y otras

Tabla 27-2. Nombres de los ácidos biliares, su contribución relativa a la fuente total de los ácidos biliares y sus concentraciones normales en suero.

Nombre	Cantidad relativa (%) en la bilis	Concentración normal en suero
Coliglicina	38	0.2- 0.9
Deoxicoliglicina	20	0.08-0.7
Litocoliglicina	4	0.07-0.3
Quenodeoxicoliglicina	38	0.05- 0.2
De Shaw LM: <i>Lab Management</i> 20:56-63, 1982		



Tabla 27-3. Concentraciones y cambios en la concentración de bilirrubina y de sus metabolitos en los individuos sanos y en los individuos con ictericia.

Condición:	Sanos
<u>Suero:</u>	
Bilirrubina total:	2-10 mg/L
Bilirrubina conjugada:	0-2 mg/L
<u>Orina:</u>	
Bilirrubina:	Negativa
Urobilinógeno:	0.5-3.4 mg/día
Pigmento en heces:	Café

Condición:	Ictericia prehepática
<u>Suero:</u>	
Bilirrubina total:	Aumentada
Bilirrubina conjugada:	Normal
<u>Orina:</u>	
Bilirrubina:	Negativa
Urobilinógeno:	Aumentado
Pigmento en heces:	Normal

Condición:	Ictericia Hepática:
Condición:	Enfermedad hepatocelular
<u>Suero:</u>	
Bilirrubina total:	Aumentada
Bilirrubina conjugada:	Aumentada
<u>Orina:</u>	
Bilirrubina:	Positiva
Urobilinógeno:	Disminuido (normal)
Pigmento en heces:	Café claro
Condición:	Enfermedad de Gilbert
<u>Suero:</u>	
Bilirrubina total:	Aumentada
Bilirrubina conjugada:	Normal
<u>Orina:</u>	
Bilirrubina:	Negativa
Urobilinógeno:	Disminuido (normal)
Pigmento en heces:	Normal
Condición:	Síndrome de Crigler-Najar
<u>Suero:</u>	
Bilirrubina total:	Aumentada
Bilirrubina conjugada:	Disminuida
<u>Orina:</u>	
Bilirrubina:	Negativa
Urobilinógeno:	Disminuido
Pigmento en heces:	Café claro



Condición:	Síndrome de Dubin- Johnson
<u>Suero:</u>	
Bilirrubina total:	Aumentada
Bilirrubina conjugada:	Aumentada
<u>Orina:</u>	
Bilirrubina:	Positiva
Urobilinógeno:	Disminuido (normal)
Pigmento en heces:	Café claro
Condición:	Ictericia posthepática obstructiva
<u>Suero:</u>	
Bilirrubina total:	Aumentada
Bilirrubina conjugada:	Aumentada
<u>Orina:</u>	
Bilirrubina:	Positiva
Urobilinógeno:	Disminuido
Pigmento en heces:	Café claro

Tabla 27-4. Cambio de los analitos séricos con la enfermedad.

Fosfatasa alcalina:	Hepatitis aguda (viral y otras) ↑
GGT:	↑
5'-nucleotidasa:	↑
ASAT:	↑↑↑
ALAT:	↑↑
Acidos biliares:	↑↑
Albumina:	N
NH3:	N, ↑
Fosfatasa alcalina:	Hepatitis alcohólica (drogas) N, ↑
GGT:	↑↑↑
5'-nucleotidasa:	↑
ASAT:	↑
ALAT:	↑
Acidos biliares:	↑
Albumina:	N
NH3:	N, ↑
Fosfatasa alcalina:	Enfermedad crónica hepatocelular N, ↑
GGT:	N, ↑
5'-nucleotidasa:	N, ↑
ASAT:	↑
ALAT:	↑
Acidos biliares:	↑
Albumina:	↓

NH3:	N, ↑	
		Cirrosis
Fosfatasa alcalina:	N, ↑	
GGT:	N, ↑	
5'-nucleotidasa:	N, ↑	
ASAT:	N, ↑	
ALAT:	N, ↑	
Acidos biliares:	↑	
Albumina:	↓	
NH3:	N, ↑	
		Síndrome de Reye
Fosfatasa alcalina:	N	
ASAT:	↑	
ALAT:	↑	
NH3:	↑↑	
		Hepatomas
Fosfatasa alcalina:	↑↑	
GGT:	↑↑↑↑	
5'-nucleotidasa:	↑↑	
ASAT:	↑	
ALAT:	↑	
Albumina:	N, ↓	
NH3:	N	
		Enfermedad colestática
Fosfatasa alcalina:	↑	
GGT:	↑↑	
5'-nucleotidasa:	↑↑↑	
ASAT:	↑	
ALAT:	↑	
Acidos biliares:	↑	
Albumina:	N	
NH3:	N	
N, Normal; ↑ elevado; ↓ disminuido		

Tabla 27-5. Métodos para el análisis de alanina aminotransferasa (ALAT).

Método	Tipo de análisis	Principio	Uso
1. Colorimétrico	Cuantitativo	Medición de absorbancia de punto final a 505 nm: Ala + α-KG → Glu + Pir Pir + DNFH → Pir-DNF-hidrazona	Suero, histórico
2. Enzimático (con monitoreo	Cuantitativo	Monitoreo UV de la desaparición de NADH a 340 nm:	Suero, el método más



ultravioleta)	$\text{Ala} + \alpha\text{-KG} \rightarrow \text{Glu} + \text{Pir}$	usado.
	LD	Algunos
	$\text{Pir} + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{Lac} + \text{NAD}^+$	usan
		cofactor de
		P- 5'-F

Tabla 27-6. Métodos para el análisis de albúmina.

Método:	1. Contenido de triptófano
Tipo de análisis:	Cuantitativo
Principio:	Acido glioxílico y el triptófano en las globulinas \rightarrow <i> cromógeno púrpura</i> (A_{max} 540 nm) Proteína total = globulina = albúmina
Uso:	Suero, manual y automatizado
Comentario:	Correlaciona bien con la electroforesis pero requiere la determinación de proteínas totales
Método:	2. Unión con colorantes
Método:	a. VBC (verde de bromocresol)
Tipo de análisis:	Cuantitativo
Principio:	El complejo colorante albúmina produce un desplazamiento en el espectro del colorante (A_{max} 628 nm)
Uso:	Suero, manual o automatizado (es el método más usado)
Comentario:	No es específico para la albúmina si la lectura se toma después de 30 segundos
Método:	b. PBC (púrpura de bromocresol)
Tipo de análisis:	Cuantitativo
Principio:	Igual al anterior (A_{max} 603 nm)
Uso:	Suero, manual o automatizado
Comentario:	Específico para albúmina; sensibilidad baja; las albúminas de fuentes animales no reaccionan igual que la albúmina humana
Método:	c. ABF (azul de bromofenol)
Tipo de análisis:	Semicuantitativo
Principio:	El azul de bromofenol en la tira reactiva cambia el color de amarillo a azul en presencia de albúmina
Uso:	Orina
Comentario:	No específico; más sensible para la albúmina; es el método más común en uso para las proteínas urinarias.
Método:	3. Electroforesis



Tipo de análisis: Cuantitativa

Principio: Se separa la albúmina de las otras proteínas en un campo eléctrico

Uso: Suero, manual y automatizado

Comentario: Requiere mucho trabajo, pero si se eluye la albúmina para medirla es muy exacta

Método: 4. Inmunoquímicos

Tipo de análisis: Cuantitativa

Principio: El porcentaje coloreado de albúmina multiplicado por el valor de las proteínas totales

Uso: La proteína migra en el campo eléctrico a través de un medio que contiene un anticuerpo específico.

Comentario: Suero, manual
Es el candidato para método de referencia

Método: a. Nefelometría

Tipo de análisis: Cuantitativo

Principio: Los complejos antígeno-anticuerpo dispersan la luz más que el antígeno libre

Uso: Suero, LCR, orina, automatizado

Comentario: Alto costo de los reactivos

Método: b. Turbidimetría

Tipo de análisis: Cuantitativo

Principio: Los complejos antígeno-anticuerpo disminuyen la transmisión de luz a través de la muestra

Uso: Suero, LCR, orina; manual o automatizado

Comentario: Alto costo de los reactivos

Método: c. Radioinmunoanálisis

Tipo de análisis: Cuantitativo

Principio: La albúmina radiomarcada compite con la albúmina de la muestra por una cantidad limitada de anticuerpo

Uso: Suero, LCR, orina
Nuevo

Método: d. Inmunoensayo enzimático

Tipo de análisis: Cuantitativo

Principio: El análisis en sandwich usa un anticuerpo ligado a una superficie y un anticuerpo marcado con peroxidasa.

Uso: Suero, LCR, orina

Comentario: Nuevo

Método: e. Inmunodifusión radial

Tipo de análisis: Cuantitativo

Principio: La proteína difunde a través del medio que contiene un anticuerpo específico

Uso: Suero, LCR, orina; manual



Comentario:	Método de referencia, tiene un período de incubación muy largo
Método:	f. Electroinmunodifusión
<i>Amax</i> , Absorbancia máxima; <i>LCR</i> , líquido cefalorraquídeo	

Tabla 27-7. Métodos para el análisis de la fosfatasa alcalina (ALP).

Tipo de análisis:	1. Espectrofotométrico de dos puntos
Fuente del método:	Shinowara et al.
Principio:	Substrato: β -glicerofosfato Se mide la velocidad de liberación del fosfato inorgánico; duración: 1 hora
Uso:	Todos los líquidos corporales; manual
Comentarios:	Requiere un tiempo de incubación largo. Las muestras tienen un fondo alto de fosfatos. Se considera obsoleto.
Tipo de análisis:	2. Espectrofotométrico de punto final
Fuente del método:	King y Armstrong
Principio:	Substrato: fenilfosfato Mide la velocidad de liberación de fenol con el reactivo de Folin-Ciocalteu; incubación: 30 minutos
Uso:	Todos los líquidos corporales; manual
Comentarios:	Las muestras requieren desproteinización. Se considera obsoleto.
Tipo de análisis:	3. Espectrofotométrico de punto final
Fuente del método:	King y King
Principio:	Substrato: fenilfosfato Mide la velocidad de liberación de fenol con 4-aminoantipirina como reactivo cromogénico; incubación : 15 min.
Uso:	Todos los líquidos corporales; manual/automático
Comentarios:	Velocidad mayor que el método de King y Armstrong. No requiere desproteinización.
Tipo de análisis:	4. Espectrofotométrico de punto final o cinético
Fuente del método:	Bessey et al.
Principio:	Substrato: <i>p</i> -nitrofenol-fosfato (<i>p</i> NPP) Se mide la velocidad de formación del ion <i>p</i> -nitrofenóxido amarillo
Uso:	Todos los líquidos corporales; manual/automático
Comentarios:	Rápida. Cambio lineal de absorbancia con el tiempo.
Tipo de análisis:	5. Espectrofotométrico de punto final o cinético
Fuente del método:	Moss

Principio:	Substrato: α -naftolmonofosfato. Se mide la velocidad de formación de α -naftol a 340 nm
Uso:	Todos los líquidos corporales; manual/automático
Comentarios:	Rápida. Tiene la conveniencia de efectuar la medición a 340 nm.
Tipo de análisis:	6. Fluorescente
Fuente del método:	Cornish et al.
Principio:	Substrato: 4-metilumbeliferilfosfato
Uso:	Todos los líquidos corporales; automatizado
Comentarios:	Altamente sensible
Tipo de análisis:	7. Espectrofotométrico cinético o de punto final
Fuente del método:	Bowers y McComb
Principio:	Substrato: <i>p</i> NPP Mide la velocidad de liberación de <i>p</i> -nitrofenóxido en solución tampón transfosforilante
Uso:	Todos los líquidos corporales; manual o automatizado
Comentarios:	Método de referencia propuesto. Más sensible que el método de Bessey et al.

Tabla 27-8. Métodos para el análisis de la aspartato aminotransferasa (ASAT).

Método:	1. Dinitrofenilhidrazona
Tipo de análisis:	Cuantitativo
Principio:	ASAT $\text{L-Aspartato} + \alpha\text{-cetoglutarato} \longrightarrow \text{L-Glutamato} + \text{Oxaloacetato}$ $\text{Oxaloacetato} + \text{Dinitrofenilhidrazina} \rightarrow \text{Oa-dinitrofenilhidrazona}$ (absorbancia a 505 nm)
Uso:	De interés histórico únicamente
Método:	2. Enzimático con monitoreo ultravioleta
Tipo de análisis:	Cuantitativo
Principio:	ASAT $\text{L-Aspartato} + \alpha\text{-cetoglutarato} \longrightarrow \text{L-Glutamato} + \text{Oxaloacetato}$ $\text{Oxaloacetato} + \text{NADH} \xrightarrow{\text{MD}} \text{Malato} + \text{NAD}$
Uso:	Es el método usado con más frecuencia
Método:	3. Enzimático con leucocolorante
Tipo de análisis:	Cuantitativo
Principio:	ASAT $\text{Aspartato} + \alpha\text{-cetoglutarato} \longrightarrow \text{L-Glutamato} + \text{Oxaloacetato}$ $\text{Oxaloacetato} \xrightarrow{\text{Oxaloacetato Decarboxylasa}} \text{Piruvato} + \text{CO}_2$ $\text{Piruvato} + \text{Fosfato} + \text{O}_2 \xrightarrow{\text{Piruvato Oxydasa}} \text{Peróxido de hidrógeno} +$



	Acetil fosfato Peróxidasa Peróxido de hidrógeno + Leucocolorante \longrightarrow <i>Compuesto coloreado</i>
Uso:	Procedimiento de capa fina Usado con poca frecuencia

Tabla 27-9. Métodos para el análisis de bilirrubina.

Método:	Malloy-Evelyn
Tipo de análisis:	Cinética, punto final con y sin blanco
Principio:	La reacción observada en la Fig. 27-2 se realiza a pH 1.2; la azobilirrubina se mide a 560 nm.
Usos:	Usada muy frecuentemente, especialmente como un procedimiento automatizado
Comentarios:	Susceptible de interferencia significativa por la hemoglobina
Método:	2. Jendrassik-Grof
Tipo de análisis:	Cinética, punto final con y sin blanco
Principio:	La reacción observada en la Fig. 27-2 se realiza a pH cercano a la neutralidad; pero el cromóforo se mide a pH alcalino (aproximadamente 13) a 600 nm.
Usos:	Es el método usado con mayor frecuencia
Comentarios:	Tiene una absortividad molar más alta y por eso es más sensible y preciso que el método de Malloy-Evelyn a concentraciones bajas de bilirrubina
Método:	3. Bilirrubinómetro
Tipo de análisis:	Espectrofotometría directa
Principio:	La concentración de bilirrubina se mide directamente por su absorbancia a 454 nm. La interferencia por la HbO ₂ se corrige restando la absorbancia a una segunda longitud de onda (540 nm).
Usos:	No se usa con frecuencia. Usada principalmente para análisis neonatal
Comentarios:	Es muy simple para realizar, pero tiene interferencias fuertes por los carotinoides
Método:	4. Cromatografía líquida de alta resolución
Tipo de análisis:	Separación cromatográfica
Principio:	Se detectan los metil-ésteres de la bilirrubina conjugada y no conjugada a 430 nm Sólo para investigación Puede convertirse en el método de referencia



Método:	5. Bilirrubina Oxidasa
Tipo de análisis:	Cinética, punto final
Principio:	La bilirrubina se oxida enzimáticamente a biliverdina y agua. La reacción se monitoriza a 405 o 460 nm
Usos:	Usada muy raramente
Comentarios:	Puede convertirse en el método de referencia; no presenta interferencia por hemoglobina
Método:	6. Desplazamiento espectral
Tipo de análisis:	Punto final
Principio:	Al unir la bilirrubina a un polímero catiónico hidrofóbico, se produce un desplazamiento en el espectro de la bilirrubina. Se relaciona la concentración de bilirrubina a la magnitud del cambio medida por fotometría de reflectancia
Usos:	Sólo está disponible en el Ektachem de Johnson y Johnson
Comentarios:	No presenta interferencia por la hemoglobina. Puede medir la concentración de bilirrubina delta.
<i>HbO₂</i> , Oxihemoglobina	

Figuras

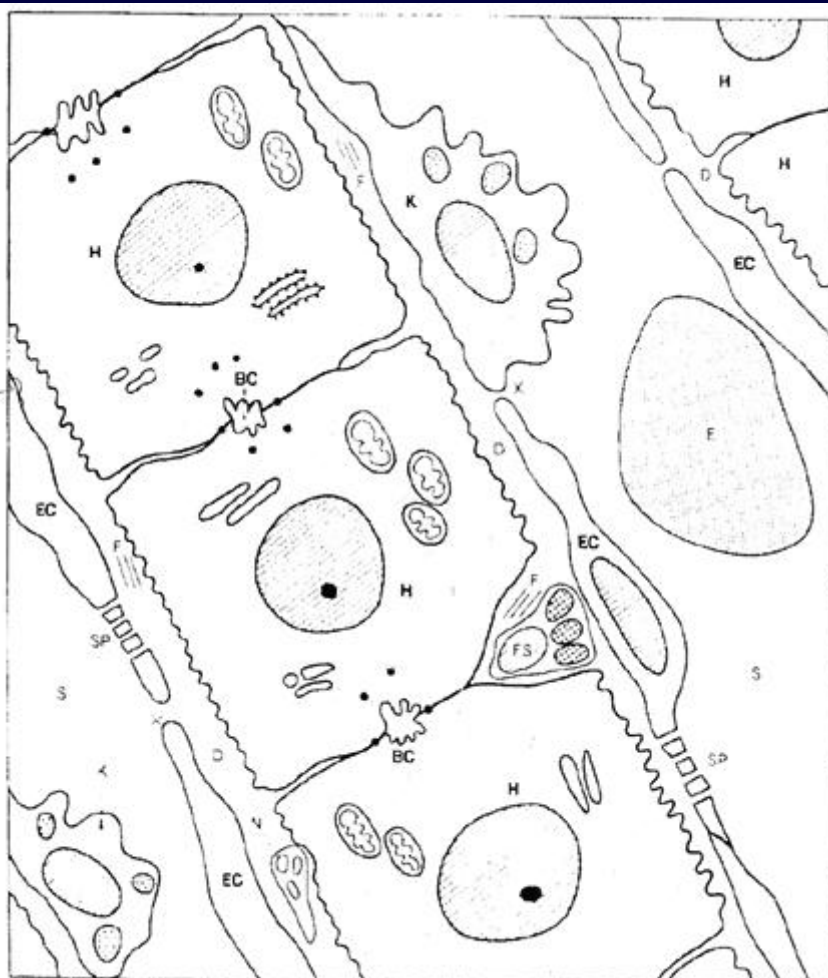


Figura 27-1 Esquema de las estructuras dentro del lóbulo. *BC*, canalículo biliar; *D*, espacio de Disse; *E*, eritrocito; *EC*, célula endotelial; *F*, fibras reticulares; *FS*, célula almacenadora de grasa; *H*, hepatocito; *K*, célula de Kupffer; *N*, célula nerviosa; *S*, sinusoide; *SP*, fenestras de célula endotelial formando una malla; *X*, espacio intercelular. (From Tanikawa K, editor: *Ultrastructural aspects of the liver and its disorders*, ed2, Tokyo, New York, 1979, Igaku-Shoin).

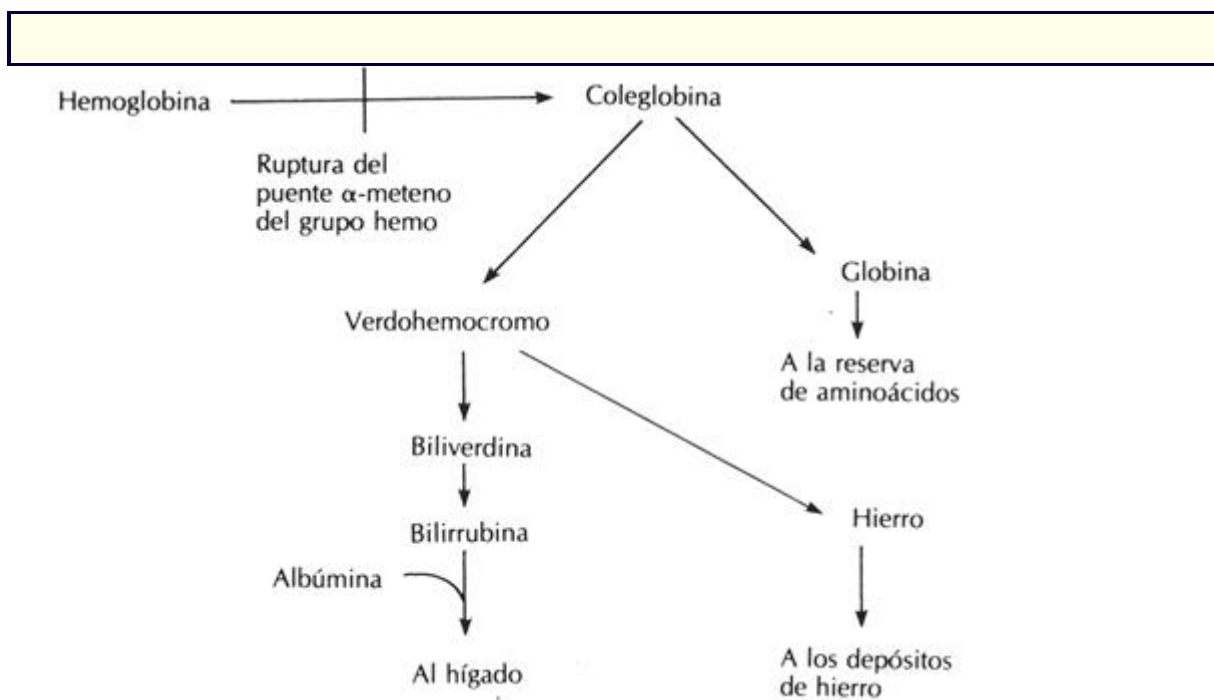


Figura 27-2 La formación de bilirrubina a partir de la hemoglobina ocurre primariamente en los tejidos reticuloendoteliales.

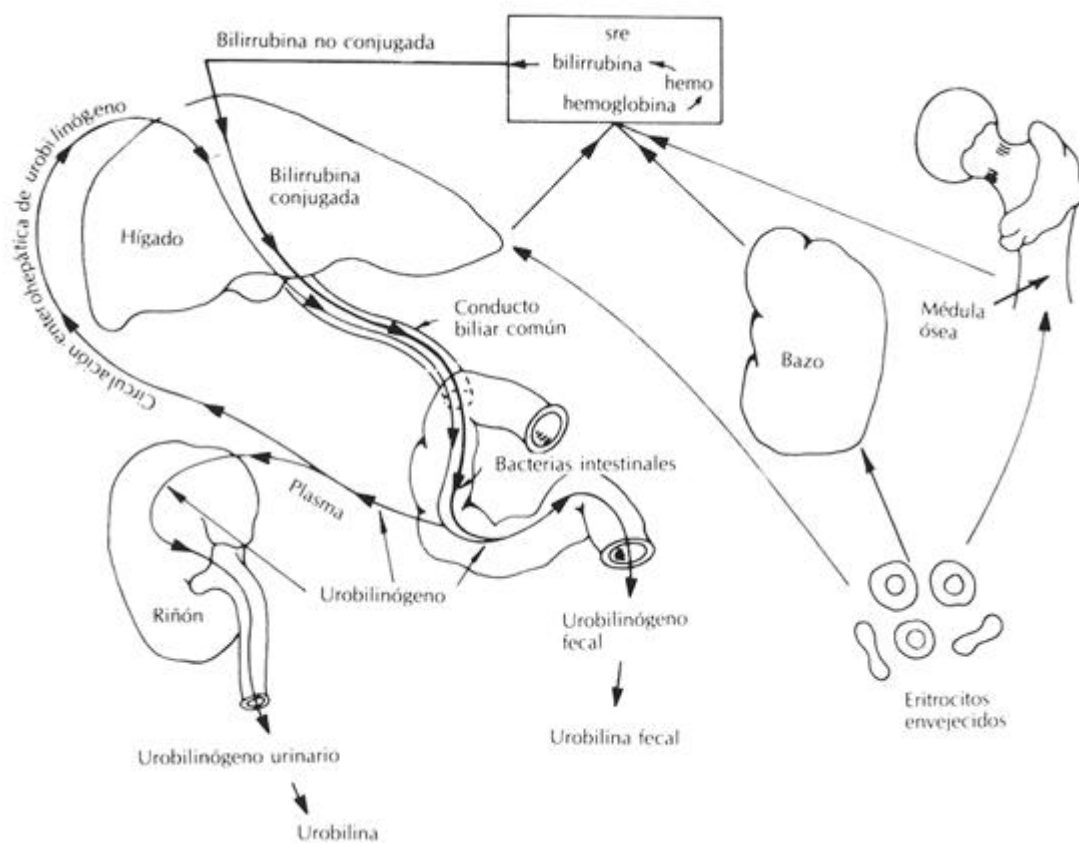


Figura 27-3 Metabolismo de la bilirrubina. (De Bauer JD, editor: *Clinical Laboratory Methods*, 9a de. St. Louis, 1982, Mosby.)



Figura 27-4 Mecanismos de hiperbilirrubinemia. A, Metabolismo normal de la bilirrubina con captación de la bilirrubina no conjugada por el hepatocito (*flecha oscura*) y conjugación microsomal y excreción de la bilirrubina conjugada (*flecha*) B, Ictericia hemolítica en la cual la producción aumentada de bilirrubina provoca una excreción aumentada de bilirrubina conjugada y una elevación excesiva (La cual supera la capacidad del hígado) de la bilirrubina no conjugada en la sangre. C, Enfermedad de Gilbert, en la cual la captación hepática disminuida provoca un incremento grande en los niveles sanguíneos de bilirrubina no conjugada. D, Ictericia fisiológica, en la cual el sistema de conjugación microsomal no funciona provocando un incremento grande en la bilirrubina no conjugada. La deficiencia congénita se conoce como el síndrome de Crigler-Najer. E, Síndrome de Dubin-Johnson en el cual hay un defecto bioquímico impidiendo la secreción de la bilirrubina conjugada provocando un reflujo a la sangre. F, Obstrucción intrahepática extrahepática en la cual un bloqueo físico impide la secreción de la bilirrubina conjugada. La enfermedad hepatocelular provoca un patrón similar a la combinación de C y D. (De Leevy CM, editor: *Evaluation of liver function*, ed 2, Indianápolis, 1974, Lilly Research Laboratories.)

Función hepática

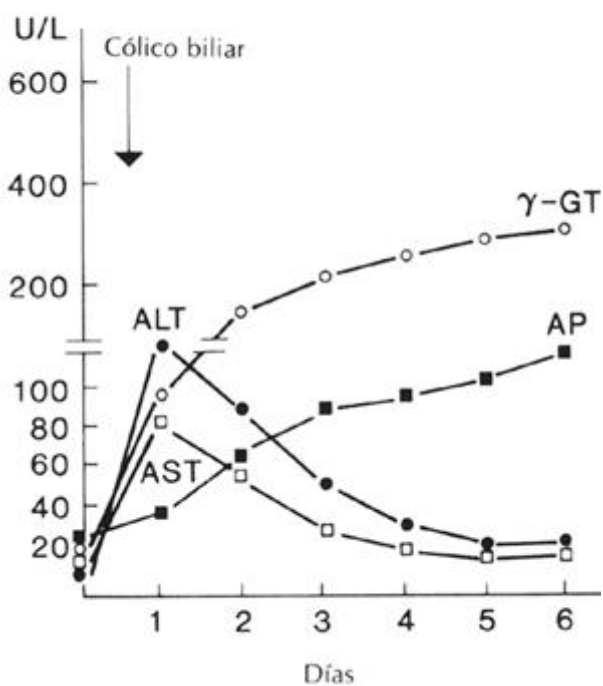


Figura 27-5 Curso de las actividades enzimáticas séricas en la ictericia obstructiva (De Schmidt E, Schmidt FW: *Brief guide to practical enzyme diagnosis*, Houston, 1977, Boehringer Mannheim Diagnostics.)

5 Fisiopatología

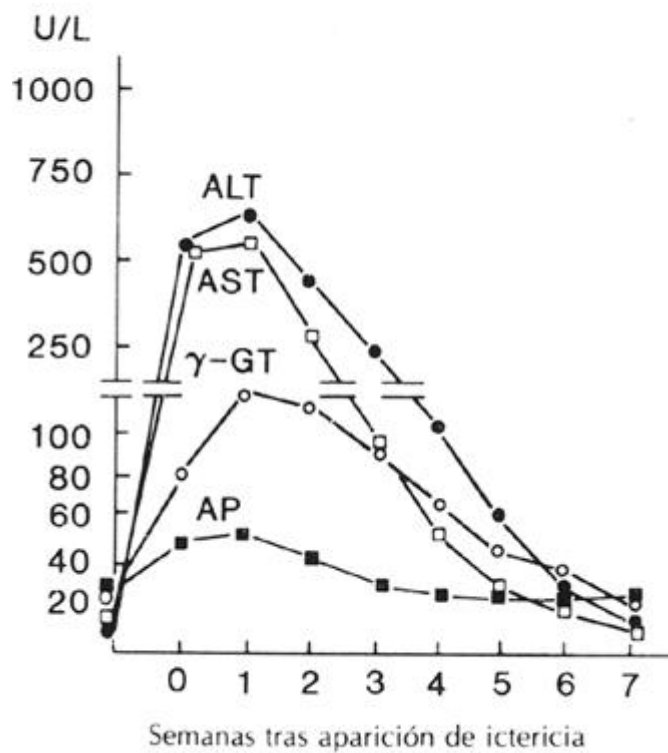
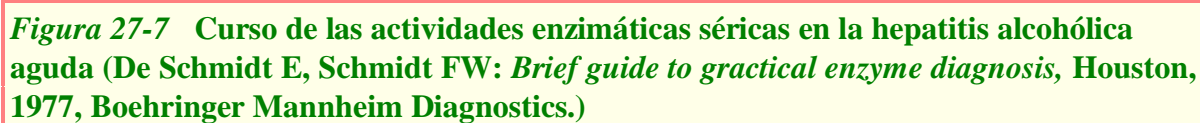


Figura 27-6 Curso de las actividades enzimáticas séricas en la hepatitis viral aguda (De Schmidt E, Schmidt FW: *Brief guide to practical enzyme diagnosis*, Houston, 1977, Boehringer Mannheim Diagnostics.)





esterificadas y no esterificadas de bilirrubina para formar derivados de azobilirrubina.
Me, grupo-CH₃ ; R, grupo-CH=CH₂.

CAPÍTULO 28

28. Enfermedad Ósea

Oussama Itani

Reginald C. Tsang

Hueso estructura y función

Estructura ósea

Masa ósea

Función ósea

Marcadores bioquímicos del remodelamiento óseo

Remodelamiento óseo

Regulación hormonal del remodelamiento óseo

Bioquímica y fisiología

Fisiología mineral

Fisiología hormonal

Enfermedades óseas

Osteoporosis

Osteomalacia

Osteitis fibrosa

Enfermedad de Paget

Enfermedades óseas hereditarias

Cambio del compuesto analizado en la enfermedad

Vitamina D

Hormona paratiroidea

Calcio

Magnesio

Fosfato

Calcitonina

Fosfatasa alcalina (FAL)

Osteocalcina

Hidroxiprolina

Métodos de análisis

Calcio



Magnesio
Fósforo

OBJETIVOS

- ♦ Describir la estructura y función del hueso normal.
- ♦ Describir los efectos de los metabolitos de la vitamina D, la hormona paratiroidea, el magnesio, y el fósforo sobre el metabolismo y la regulación del calcio.
- ♦ Definir la osteopenia, la osteoporosis, la osteomalacia, el raquitismo, la osteitis fibrosa, y la enfermedad de Paget.
- ♦ Presentar los niveles esperados de calcidiol, hormona paratiroidea, calcio, fósforo, magnesio, calcitonina, fosfatasa alcalina, e hidroxiprolina urinaria en los estadios de las enfermedades listadas antes.

Términos Clave

calcidiol 25-Hidroxivitamina D (25-OHD) es el coilecalciferol hidroxilado en el hígado en el carbón en la posición 25

calcitriol 1,25-Dihidroxivitamina D [1,25(OH)₂D], el metabolito activo de la vitamina D, es el coilecalciferol hidroxilado en ambas posiciones en el carbón-1 y en el carbón-25.

coilecalciferol El compuesto padre de la vitamina D.

hueso cortical Hueso compacto denso que provee de soporte a la estructura diáfisis La parte de un hueso largo.

epífisis La parte terminal del hueso.

metáfisis Región en la cual la diáfisis y al epífisis convergen.

osteoblastos Células que sintetizan la matriz ósea.

osteoclastos Células que resorben hueso.

osteocitos Células de hueso maduro que tiene limitada función y están encajadas en la matriz ósea, composición que ayudan a mantener.

osteoblastos Células que sintetizan la matriz ósea.

osteoclastos Células que reabsorben hueso

osteocitos Células óseas maduras que tienen una función limitada y están encajadas en la matriz ósea, composición que ayudan a mantener

osteoide Matriz ósea

osteomalacia Enfermedad del hueso que contiene cantidades normales de osteoide pero deficiente cantidad de mineral.

osteopenia La apariencia radiográfica de hueso mineralizado anormal.

osteoporosis Una reducción generalizada de la masa ósea que involucra tanto al mineral como al osteoide.

raquitismo Osteomalacia de la niñez

hueso trabecular Espículas de hueso intercaladas que predominantemente involucran a la



homeóstasis mineral

Estructura y Función Ósea

Más del 90% de las células óseas están encapsuladas en el tejido calcificado y separadas a gran distancia del sistema vascular. Esto da a las células la apariencia de inactivas. Sin embargo, está claro que el sistema esquelético es un órgano dinámico. La teoría moderna de la función del sistema esquelético propone que el hueso tiene dos papeles interdependientes: la provisión del soporte y el mantenimiento de la homeostasis mineral. Ambas funciones se llevan a cabo satisfactoriamente mediante el continuo remodelamiento del hueso. Alteraciones en el balance y la naturaleza de la formación y resorción ósea producen las enfermedades óseas.

Estructura ósea

Microscópicamente, los principales huesos están clasificados como huesos largos o huesos planos.^{ref(685)} Los huesos largos forman las extremidades y consisten de un extremo (*diáfisis*), dos terminaciones (*epífisis*), y una región en la cual los dos convergen (*metáfisis*) (Fig. 28-1, A). Visto en sección transversal, la diáfisis está formada por líneas de hueso compacto (*cortical*) y denso, mientras que la metáfisis contiene espículas de hueso intercaladas que semejan la estructura de una esponja (*hueso trabecular* o *cancelus*) (Fig. 28-1, B). Los huesos planos, ejemplificados por los huesos del esqueleto, consisten de dos capas de hueso cortical que encierran una capa de hueso trabecular. El hueso cortical denso provee de la fuerza necesaria para soportar la estructura, y las espículas del hueso trabecular proveen de una área de larga superficie para la síntesis del hueso y la resorción y proveen de un reservorio de minerales para el mantenimiento de la homeostasis mineral.

El hueso consiste de tres tipos principales de células, *osteoblastos*, *osteocitos* y *osteoclastos*.^{ref(686)} Los *osteoblastos*, se encuentran a lo largo de las superficies de ambos huesos, cortical y trabecular, y sintetizan la matriz ósea. La membrana plásmica del osteoblasto es muy rica en fosfatasa alcalina, cuya actividad es un índice de la formación ósea. Los osteoblastos tienen receptores para la hormona paratiroidea (HPT), 1,25-dihidroxitamina D, [1,25(OH)2D] y los estrógenos, pero no para la calcitonina. La estimulación con HPT, 1,25(OH)2D, hormona de crecimiento, y estrógenos causa que los osteoblastos produzcan el factor de crecimiento a insulina (MÁS-1), el cual tiene un papel muy significativo en la regulación del hueso a nivel local y de moldeo. Tan pronto los osteoblastos forman parte de la matriz ósea, se diferencian en *osteocitos* maduros. Los osteocitos sintetizan pequeñas cantidades de matriz en forma continua para mantener la integridad del hueso, y son capaces de resorber hueso (osteolisis osteocítica) en circunstancias excepcionales cuando la homeostasis mineral normal es alterada.

Los *osteoclastos* contienen enzimas que desmineralizan y digieren la matriz ósea. El proceso de la resorción ósea osteoclástica ha sido entendida muy recientemente. La resorción ósea ocurre en cierta parte de la membrana del osteoclasto, "la membrana en cepillo", la cual comprende un compartimiento lisosomal sellado. Debido a su pH ácido, los lisosomas disuelven los cristales de hueso, y sus enzimas proteolíticas digieren la matriz ósea.^{ref(687)} A



pesar de que la resorción ósea se afecta primeramente por los osteoclastos, otras células influenciadas por hormonas que resorben hueso pueden dirigir a los osteoclastos. Ambos, los osteoblastos y los osteoclastos tienen receptores para hormonas que resorben hueso y juegan un papel muy significativo en la resorción ósea. La apariencia de mordida en el hueso que indica que la absorción es evidente se presenta en las secciones histológicas de las áreas donde los osteoclastos se encuentran en gran número.

Solo una pequeña porción de hueso es celular; predomina la matriz calcificada. Esta matriz está principalmente formada por fibrillas de colágeno (principalmente tipo I), por glicosa-aminoglicanos que contienen sustancia gris y proteínas de tipo no colágeno. El colágeno tipo I es el colágeno de mayor producción por los osteoblastos y representa más del 90% en peso del hueso del componente no mineral. La *osteocalcina* es el principal componente del hueso de tipo no colágeno (ver abajo). A pesar de que la mayoría de las proteínas son sintetizadas por los osteoblastos, algunas proteínas, como la alfa₂-HS-glicoproteína, se producen en el hígado y se absorben por la matriz ósea. Los cristales de hidroxiapatita en forma de espiral, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, están presentes en la sustancia gris y alineadas sobre y dentro de las fibras de colágeno. Los glicosa-aminoglicanos son complejos altamente aniónicos que pueden jugar un papel importante en el proceso de la calcificación y en la retención de los cristales de hidroxiapatita de las fibras de colágeno. Aproximadamente una cuarta parte de los aminoácidos presentes en el colágeno son prolina o hidroxiprolina, ninguna de las cuales está presente en gran escala en otros tejidos. Cuando el colágeno es metabolizado, los oligopéptidos que contienen hidroxiprolina se excretan en la orina, y la cantidad presente correlaciona con la cantidad de remodelamiento óseo. Los elementos minerales del hueso consisten principalmente de cristales de calcio y fosfato acomodados de forma amorfa o como hidroxiapatita. Una amplia variedad de elementos pueden estar presentes, incluyendo sodio, magnesio, cobre, zinc, plomo y fluoruro.

Masa ósea

Cerca del 45% del esqueleto adulto se construye y crece durante la adolescencia. El concepto de pico de masa ósea ha sido crítico para entender la osteoporosis, especialmente la osteoporosis posmenopáusica. El pico de masa ósea está determinado por varios factores incluyendo los genéticos, nutricionales, mecánicos y ambientales.^{[ref\(688\)](#)} El efecto genético en la masa ósea adulta está mediado principalmente por efectos sobre la formación premenopáusica y posmenopáusica, mas que debido a efectos de resorción. Hay una relación positiva muy fuerte entre la ingesta de calcio presente y pasada y la adquisición de la masa ósea.^{[ref\(689\)](#)} Una ingesta alta de calcio durante la adolescencia teóricamente puede optimizar, dentro de límites genéticos, el pico de masa ósea.^{[ref\(690\)](#)} La actividad física, el uso de contraceptivos orales estrogénicos, y una ingesta de calcio dietético ejercen un efecto positivo sobre la ganancia de hueso en las mujeres jóvenes adultas.^{[ref\(691\)](#)} Los andrógenos y los estrógenos son determinantes importantes para la densidad del pico de masa ósea en mujeres jóvenes.^{[ref\(692\)](#)} La ingesta de calcio dietética en el crecimiento óseo es un factor básico. Los requerimientos para la retención de calcio en el crecimiento son como sigue: un promedio de 100 mg/día se debe retener durante la infancia, 220 mg/día durante la adolescencia, y probablemente 20 o 30 mg/día durante el crecimiento temprano del adulto entre 20 y 30 años de edad.

Función ósea

La gran superficie de área y un excelente riego de sangre sobre el hueso trabecular permite una respuesta rápida ante perturbaciones en la concentración de minerales plasmáticos. En contraste, la abundante matriz calcificada del hueso cortical provee de la fuerza para soportar el peso del cuerpo. A pesar de la segregación entre la estructura y la función, las alteraciones en ambos coexisten a menudo. Algunos ejemplos incluyen la deficiencia de vitamina D, que causa tanto hipocalcemia como fácilmente fracturas de hueso, e inmovilización, que causan resorción ósea, osteoporosis, e hipercalcemia. Bajo circunstancias normales, estas alteraciones no ocurren porque, en el *remodelamiento óseo* esto sucede a través del cuerpo, la formación ósea y la resorción ósea están acopladas, resultando en cantidades iguales de hueso formado y resorbido.^{ref(693)} La mayoría de las enfermedades óseas resultan de las alteraciones entre el acoplamiento que son nuevas o secundarias a un desbalance hormonal, que produce ya sea una excesiva formación o excesiva resorción ósea.

Marcadores bioquímicos del remodelamiento óseo

El proceso de formación y resorción ósea se acompaña de la producción de una cantidad de proteínas. La determinación de varias de estas moléculas en el suero proveen un valioso indicador del proceso de la homeostasis ósea (**ver el cuadro**). Estos marcadores sirven de indicadores no invasivos de las actividades osteoblásticas y osteoclásticas. Los principales marcadores de la actividad osteoblástica y por lo tanto de la formación ósea son la fosfatasa alcalina y las proteínas de la matriz ósea, en particular la osteocalcina.

La *osteocalcina* es la principal de las proteínas de tipo no colágeno. Es una proteína de 49 aminoácidos que es sintetizada en los osteoblastos. La osteocalcina puede servir como un marcador de la actividad osteoblastica y de la formación ósea. Contiene ácido gama carboxiglutamico, que es un aminoácido dependiente de la vitamina K. La mayoría de la osteocalcina sintetizada es incorporada al hueso donde constituye el 1% de la matriz orgánica ósea. Pequeñas cantidades de osteocalcina en la circulación se derivan de la proteína sintetizada de nueva formación mas que de la resorción de la matriz ósea. La síntesis de osteocalcina es estimulada por $1,25(\text{OH})_2\text{D}$.

Procolageno, *osteonectina*, y *sialoproteína* ósea (BSP, o osteopontina)son secretadas a la circulación por los osteoblastos. Sin embargo, la última de ellas es también producida por las plaquetas, y parece que el análisis del propéptido del procolágeno es un indicador de la formación de hueso menos sensible y específico que el análisis de la osteocalcina serica o la isoenzima de la fosfatasa alcalina.^{ref(694)}

Los *aminoácidos de los enlaces de piridinolina del colágeno en orina* son probablemente los marcadores más específicos que hay actualmente para la resorción ósea.^{refs(695)} Estos compuestos incluyen la hidroxilisilpiridinolina y la lisilpiridinolina.^{ref(696)}

Remodelamiento óseo

Inherente a la fisiología es el "acoplamiento" fisiológico del proceso de la formación y resorción ósea, llamado *remodelamiento*.^{ref(697)} El remodelamiento continúa durante toda la vida y requiere de un balance entre la formación y la resorción ósea. En cualquier momento aproximadamente el 10% de la masa ósea participa en el remodelamiento óseo. El crecimiento, durante la infancia y la adolescencia está asociado predominantemente con la formación ósea sobre la resorción ósea, resultando en un aumento de la masa ósea depositada. En los adultos jóvenes, los procesos de formación y resorción ósea son iguales. Con el



envejecimiento, la resorción ósea excede a la formación ósea por lo que hay una predisposición en el individuo viejo hacia la osteoporosis y la pérdida de hueso. En las enfermedades óseas, este balance está alterado. Por ejemplo, en la osteoporosis el volumen de hueso resorbido sobrepasa el volumen de hueso formado, resultando en la pérdida neta de hueso en cada sitio de remodelamiento.

Regulación hormonal del remodelamiento óseo^{ref(698)}

El balance dinámico entre la formación y la resorción está controlado por ambos reguladores sistémicos y locales. Los reguladores sistémicos de la homeostasis ósea incluyen primeramente a las hormonas calciotrópicas (HPT y vitamina D). Los reguladores locales de la homeostasis de hueso involucran a los factores de crecimiento y a las prostaglandinas, como son MÁS-I y II,^{ref(699)} los cuales actúan como efectores autocrinos o paracrinos de la formación ósea al aumentar la proliferación osteoblastica y la biosíntesis de la matriz ósea.

La hormona paratiroidea y la 1,25(OH)₂D juegan un papel importante en la actividad del remodelamiento óseo. La HPT estimula la formación, posiblemente a través de la producción de los factores de crecimiento locales FCI-I y FCI-II; por otro lado, la administración continua de HPT tiene un efecto catalítico sobre el hueso y favorece la resorción ósea. Las prostaglandinas, particularmente la serie de las E, son potentes agentes locales de resorción ósea. La 1,25(OH)₂D y las hormonas tiroideas también tienen un efecto bifásico sobre la homeostasis del hueso^{ref(700)}. La tirotoxicosis es un factor de riesgo significativo para la osteoporosis. La hormona de crecimiento también tiene un efecto anabólico sobre el metabolismo óseo; estimula la formación ósea al aumentar la concentración local de FCI-I.^{ref(701)} El estradiol y la progesterona estimulan la actividad osteoblástica al aumentar la formación ósea,^{ref(702)} y los estrógenos aumentan la producción de FCI-I y FCI-II. Varias citoquinas ejercen efecto activador osteoclástico y promueven la resorción osteoclástica.^{refs(703)} Estas citoquinas incluyen la interleuquina-1, los factores de necrosis tumorales alfa y beta, y el factor que induce la diferenciación. Los osteoclastos tienen receptores para la calcitonina. La calcitonina directamente inhibe la resorción ósea al unirse a receptores específicos en los osteoclastos que inhiben la formación osteoclástica, la motilidad y la actividad.^{ref(704)}

Bioquímica y Fisiología

Fisiología mineral

El calcio y el metabolismo mineral representan un delicado y complejo proceso biológico que comprende muchos componentes interrelacionados. El metabolismo homeostático normal depende de la disponibilidad de los substratos minerales y de las interacciones de los tejidos como el hueso, el riñón, y el tracto gastrointestinal con las hormonas calciotrópicas HPT, calcitonina (CT), y 1,25(OH)₂D.

Calcio y fósforo.

El calcio es el quinto elemento más abundante en el cuerpo humano. El cuerpo humano contiene cerca de 1200 g de calcio en el adulto y aproximadamente 28 g en el nonato recién nacido a término. Casi todo el calcio del cuerpo (99%) reside en el hueso. El



remanente reside en los fluidos del cuerpo y tiene un papel crítico muy importante en un sin número de procesos fisiológicos incluyendo la contracción muscular, la neurotransmisión, el transporte de membrana, las reacciones enzimáticas, la secreción hormonal, y la coagulación sanguínea. En la circulación, el calcio existe en tres formas: 45% del calcio sérico total es la forma biológicamente activa de calcio iónico, 45% está unido a la proteína principalmente albúmina, y 10% está unido a complejos aniónicos (fosfato, lactato, citrato).^{ref(705)}

El hueso contiene de 80 a 85% del fósforo corporal total; aparentemente 9% se encuentra en músculo, y el resto está en las vísceras y líquido extracelular. La concentración intracelular de fósforo (fosfatos y fósforo inorgánico) es mayor que la de los niveles extracelulares.

Metabolismo. En el adulto, el calcio dietético es absorbido por el intestino mediante proteínas específicas unidas al calcio. Este proceso está bajo el control activo de la vitamina D (ver el texto siguiente para información detallada). La mayoría del calcio que se absorbe se deposita en los huesos. La principal ruta de excreción de calcio en el cuerpo es a través de los riñones. Ambos procesos, el depósito y la excreción renal, están bajo el control de la HPT, como se describe a continuación. El control de la homeostasis de calcio sérico está bajo el control de HPT y también se discutirá enseguida.

Mediante un proceso activo dependiente de energía, la placenta transfiere los iones de calcio de la madre al feto en contra de un gradiente de concentración. Esto resulta en una relativa hipercalcemia fetal con concentración alta de calcio en el cordón umbilical mas que en la sangre materna. Una proteína intrínseca placentaria dependiente de la unión al calcio (CaBP, calbindina) está presente solo en la presencia de receptores específicos para $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, que han sido demostrados en la placenta humana y en el intestino del feto humano. Es probable que calbindina juegue un papel significativo en la placenta en el transporte activo de calcio de la placenta al feto.

Magnesio.

El magnesio (Mg) es el cuarto catión más abundante en el cuerpo en general y el segundo catión más abundante intracelularmente en el cuerpo. La mayoría del contenido de Mg corporal (50% a 60%) está concentrado en el tejido óseo como un componente integral de la hidroxiapatita (30% a 40%) y como una fracción intercambiable (15% a 20%) absorbida a la apatita y en equilibrio con el compartimento fluido extracelular. Cerca del 20% del Mg total del cuerpo está concentrado en los músculos y otro 20% está en el compartimento intracelular de las células sanguíneas y de otros tejidos corporales. Cambios en el contenido total de Mg corporal se reflejan principalmente mediante cambios en el Mg del esqueleto y en cierta medida en la concentración sérica de Mg. Solo el 1% del magnesio del cuerpo está en la sangre. El magnesio sirve como un cofactor de multitud de reacciones enzimáticas involucradas en el almacenamiento, transferencia, producción de la energía y de la síntesis de ácidos nucleicos. Es más, el Mg juega un papel muy significativo en la homeostasis del calcio y del hueso.

Metabolismo. El magnesio se absorbe a través del tracto intestinal, cuya absorción va desde el 44% en la dieta ordinaria a 76% en una dieta baja en magnesio. Hay una conservación eficiente de magnesio por el riñón, por lo que en la deficiencia de magnesio sólo una excreción extremadamente baja tiene lugar. La HPT parece que causa un aumento en las concentraciones de magnesio, posiblemente al movilizar magnesio del hueso. En condiciones

agudas un aumento en la concentración de magnesio sérico da como resultado la supresión de las glándulas paratiroides, y así, teóricamente previene un posible aumento de la hormona paratiroidea y completa el ciclo de "retroalimentación" en la interrelación magnesio-paratiroides.[ref\(706\)](#)

Este mecanismo de retroalimentación es entonces similar al que ocurre en la interrelación calcio-paratiroides (ver pág. 534). Aunque un agudo descenso del magnesio en suero parecería que aumenta la concentración de HPT, la deficiencia crónica de magnesio disminuye la liberación de HPT. Además de este impedimento de la función paratiroidea, la deficiencia de magnesio puede disminuir la respuesta a los órganos diana a HPT. Así entonces la disminución de magnesio produciría hipoparatiroidismo, y de forma secundaria, hipocalcemia. La hipocalcemia también se puede acompañar de deficiencia de magnesio ya que el calcio liberado del hueso está disminuido. Bajo circunstancias normales, el magnesio y el calcio sufren un intercambio en el hueso relacionado con su liberación a la circulación. La concentración baja de magnesio en el hueso resultaría en un intercambio disminuido de calcio y una liberación disminuida de calcio del hueso.[ref\(707\)](#)

Fisiología hormonal

Vitamina D.

La atención que se puso sobre la vitamina D, desde su descubrimiento en 1925 permitió la eliminación de un problema difundido, el raquitismo nutricional. Inicialmente considerada una vitamina porque los pacientes con raquitismo se curaban con un suplemento oral de vitamina D, la vitamina D está ahora considerada como una hormona.[ref\(708\)](#) La principal fuente de vitamina D no es la dieta, sino su producción en la piel después de exponerse a la luz del sol.[ref\(709\)](#) La vitamina D en la dieta incluye la D₂ (derivada de los esteroides de las plantas) y la D₃ (de origen animal o sintético). Normalmente, en los adultos, al menos el 90% de los requerimientos de vitamina D se proveen por fotosíntesis endógena en la piel, la cual puede ser de 1.5 a 10 µg/día (100 a 400 UI/día). Es entonces transportada en la circulación al hígado y a los riñones para su activación. Subsecuentemente se localiza en sitios de actividad en el intestino y en el hueso debido a la presencia de receptores específicos en estos órganos. Finalmente, como en otros sistemas hormonales, los niveles plasmáticos de vitamina D activada están rígidamente controlados por una regulación vía retroalimentación. La vitamina D es conocida como una de las tres hormonas principales en controlar la homeostasis de calcio y de fósforo y la mineralización ósea.[refs\(710\)](#)

Bioquímica y metabolismo. Bajo el efecto de una pequeña deshidrogenasa de la mucosa intestinal, el colesterol de la dieta es convertido en 7-dehidrocolesterol, el cual es entonces transportado a la capa malpigia de la piel (Fig. 28-2). La radiación ultravioleta (de longitud de onda 290 a 320 nm) penetra en la piel y rompe el enlace C9-C10 del 7-dehidrocolesterol (provitamina D) para formar la previtamina D₃. La previtamina D₃ sufre varias reacciones: puede ser fotoisomerizada a lumisterol y taquisterol o convertida por isomerización dependiente de la temperatura a colecalciferol (vitamina D₃). El colecalciferol es entonces liberado a la circulación donde se une a la proteína transportadora de vitamina D y es transportada al hígado.

En el hígado, el colecalciferol sufre hidroxilación en la posición 25 para producir la



25-hidroxivitamina D, o 25(OH)D (calcidiol) (Figs. 28-2 y 28-3), la cual es liberada a la circulación otra vez antes de llegar al riñón. En la mitocondria renal, la 25(OH)D sufre una hidroxilación en 1-alfa para producir la 1,25-dihidroxivitamina D (calcitriol), o una hidroxilación en 24 para formar la 24,25-dihidroxivitamina D [24,25(OH)₂D] (Fig. 28-2). La concentración plasmática de calcitriol es relativamente baja (aproximadamente 30 pg/mL). Aunque la concentración normal plasmática varía con la edad,^{ref(711)} está probablemente bajo estricto control por retroalimentación.^{ref(712)} Los detalles de este control se discuten después. Si las concentraciones de calcitriol en plasma son suficientes, el calcidiol es hidroxilado en el riñón en la posición C-24 para producir 24,25-dihidroxicolecalciferol (Fig. 28-2). Este último metabolito es conocido comúnmente entre los investigadores como un producto de desecho del metabolismo de la vitamina D. El papel de la 24,25(OH)₂D en la homeostasis mineral y de la vitamina D no está muy bien elucidado.

A pesar de que el humano recién nacido tiene concentraciones indetectables de vitamina D, los metabolitos de la vitamina D son necesarios para una óptima mineralización ósea materno-fetal humana. El feto es dependiente totalmente de la vitamina D materna. El colecalciferol y sus metabolitos pasan la circulación unidos a la proteína transportadora de vitamina D.^{ref(713)} Ciertos tejidos contienen una proteína intracelular que sirve de receptor específico para el calcitriol. Esta proteína, localizada en el citosol del riñón, intestino, hueso y otros tejidos seleccionados, funciona como otro receptor para esteroides hormonales celulares (ver capítulo 40). Esto facilita la entrada de calcitriol a la células y el transporte de calcitriol al núcleo de la célula, donde la hormona en teoría, dirige la síntesis proteica para alcanzar el efecto deseado.

Mecanismos de acción.^{refs(714)} Los tres principales órganos diana del calcitriol son el intestino, el hueso y el riñón (**ver el cuadro**). El calcitriol facilita la absorción de ambos, del calcio y del fosfato en el intestino y favorece a la proteína específica transportadora de calcio, la calbindina D. El transporte de fosfatos se acompaña del transporte de calcio, pero también aumenta por un mecanismo desconocido independiente de calcio. El calcitriol trabaja cooperativamente con la hormona paratiroidea para aumentar la resorción de hueso al aumentar la actividad osteoclástica. Esto puede considerarse paradójico ya que la vitamina D se cree que aumenta la mineralización del hueso. Sin embargo, el efecto neto de la acción de calcitriol en el hueso y en el intestino es el aumentar las concentraciones de calcio y fósforo presentes, las cuales subsecuentemente facilitarán la mineralización de la matriz ósea recién formada. El calcitriol aumenta la reabsorción renal de ambos, calcio y fósforo, pero como el 99% de calcio filtrado se reabsorbe normalmente, el efecto global de la alteración en las concentraciones de calcitriol plasmático sobre la reabsorción real de calcio es pequeña.

El calcitriol tiene un efecto regulador sobre la transcripción genética de HPT y CT. En los humanos con hiperparatiroidismo secundario, la administración intravenosa de 1,25(OH)₂D lleva a una reducción fina de la concentración de HPT en suero. La administración oral de calcitriol en los niños con raquitismo hipofosfatomico e hiperparatiroidismo secundario también tiene un efecto inhibitorio sobre la secreción de HPT. El calcitriol regula positivamente a su propio receptor en las glándulas paratiroides; la administración de 1,25(OH)₂D aumenta la concentración del receptor a vitamina D en el RNAm en la glándula paratiroides.

Regulación del metabolismo de la vitamina D. La regulación el metabolismo de la



vitamina D es fácilmente entendible una vez que se conoce cual es la función del calcitriol (ver cuadro en pág. 534). Aunque los niveles en plasma de calcidiol están pobremente controlados,^{ref(715)} parece que hubiera un control relativamente estricto de las concentraciones de calcitriol plasmático. La actividad de la 1-alfa-hidroxilasa renal se estimula por la FCI-I, HPT y la hipofosfatemia y en períodos de alta demanda de calcio, como son el crecimiento, el embarazo, o la baja ingesta de calcio. La actividad puede estar inhibida por $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ y por otros metabolitos de la vitamina D.

La HPT es el estímulo principal para la formación de calcitriol.^{ref(716)} La HPT puede estimular a la 1-alfa-hidroxilasa, la enzima que hidroxila el calcidiol en la posición C-1, indirectamente al disminuir la concentración de fósforo intracelular. Ya que la disminución de fósforo aumenta la síntesis de calcitriol en los animales normales o paratiroidectomizados, la disminución de los niveles de fósforo intracelular pueden ser el estímulo común para la síntesis de calcitriol.

El entender el control metabólico de la vitamina D nos permite comprender mejor el control de las concentraciones de calcio y fósforo en el suero (Fig. 28-4). Cuando la concentración de calcio en el suero disminuye, se secreta HPT para restablecer inmediatamente las concentraciones de calcio estimulando a los osteoclastos a resorber hueso. En horas, la producción de calcitriol aumenta, lo cual causa que la absorción de calcio intestinal aumente, lo cual subsecuentemente restablece la concentración de calcio e indirectamente la concentración de HPT a la normalidad. La elevación en la concentración de calcio produce un efecto opuesto, esto es, una reducción en suero de ambas, la concentración de HPT y la síntesis de calcitriol.

Las concentraciones en plasma de calcitriol se alteran con el envejecimiento y en el embarazo; se elevan durante la adolescencia y declinan en la edad adulta.^{ref(717)} El embarazo y la subsecuente lactancia están asociados con aumento de las concentraciones de estrógenos y de prolactina; ambas hormonas aumentan la síntesis de calcitriol.^{ref(718)} Debe hacerse notar que durante el crecimiento en la adolescencia, el embarazo, y la lactancia se aumentan los requerimientos de calcio. Así, el aumento en la concentración de calcitriol representa una respuesta apropiada a las necesidades fisiológicas.

A pesar de que el recién nacido tiene concentraciones indetectables en plasma de vitamina D, los metabolitos de la vitamina D son necesarios para una óptima mineralización materna-fetal. El feto es dependiente totalmente de vitamina D materna.

Hormona paratiroidea

Bioquímica y metabolismo. La hormona paratiroidea es un polipéptido de 84 aminoácidos (9500 daltones) sintetizada en las glándulas paratiroides. La proteína precursora de la hormona paratiroidea es la hormona *preparatiroidea*. Este precursor subsecuentemente se convierte en la glándula, primero a hormona *proparatiroidea* y después a hormona paratiroidea, la cual se libera a la circulación. La actividad biológica completa reside en el péptido amino terminal 1-34; las secuencias media y carboxilo terminal (35 a 85 aminoácidos) son biológicamente inertes aunque inmunológicamente sumamente reactivas. Así, los fragmentos de la hormona paratiroidea cercanos a la terminación N generalmente son activos, mientras que aquellos que están cerca de la terminación C son inactivos.

Mecanismo de acción. La hormona paratiroidea actúa en dos órganos diana principalmente, el hueso y el riñón, para producir tres efectos: aumento en suero de las

concentraciones de calcio, disminución en suero de las concentraciones de fósforo, y aumento de la forma activa de la vitamina D (calcitriol). En el hueso, la hormona paratiroidea predominantemente metaboliza el calcio y el fósforo al fluido extracelular, al aumentar las concentraciones en suero de calcio y fósforo. La HPT tiene un efecto sinérgico junto con $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ al estimular la resorción ósea.

En el otro órgano diana, el riñón, la hormona paratiroidea causa un aumento de la retención de calcio, de la excreción de fósforo, estimulación de la actividad de la 1-alfa-hidroxilasa renal (ver arriba), y aumento de la conversión de 25-hidroxicalciferol (calcidiol) a $1,25\text{-dihidroxicolecalciferol}$ (calcitriol). El calcitriol, entonces, como se describió antes, predominantemente causa un aumento de la absorción de calcio y fósforo en el intestino. El efecto de la hormona paratiroidea en el riñón está mediado a través de la formación del monofosfato de adenosin cíclico (AMPC), donde los niveles urinarios de este compuesto aumentan cuando la producción de HPT aumenta. El efecto que resulta de la hormona paratiroidea en el hueso, riñón, e indirectamente en el intestino, es aumentar las concentraciones de calcio en la sangre. Aunque la concentración de fósforo puede elevarse a través de la acción de HPT en el hueso e indirectamente en el intestino, el efecto del aumento de la excreción urinaria de fósforo sobrepasa os otros efectos y, en total, el resultado es una disminución de la concentración de fósforo (Fig. 28-5).

La concentración de calcio ionizado (Cai) es el principal determinante de la secreción de HPT: una disminución en la concentración de Cai estimula la secreción de HPT, mientras que un aumento en la concentración de Cai la suprime. Sin embargo, otros iones y hormonas influyen la secreción de HPT por las glándulas paratiroides: por ejemplo, un aumento en suero de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ disminuye la secreción de HPT. Una disminución aguda en la concentración de Mg estimula la secreción de HPT aunque en menor escala (diez veces menos en concentración molar) comparado con el efecto de una hipocalcemia aguda.^{ref(719)} La hipomagnesemia crónica desajusta la secreción de HPT y causa desajustes en la acción de HPT en los órganos diana.^{refs(720) refs(721)} Los iones de magnesio son esenciales para la secreción mediada a través de la adenilato ciclasa por los gránulos secretores y subsecuente liberación de HPT por la células de las paratiroides. Por lo tanto, una deficiencia en magnesio puede causar una hipocalcemia secundaria. La hipermagnesemia también suprime la secreción de HPT.^{ref(722)}

Homeostasis perinatal de HPT. Teóricamente, y debido a que la HPT no cruza la placenta, la relativa hipercalcemia fetal debe suprimir a las glándulas paratiroides fetales. Paradójicamente, la secreción de HPT fetal, a pesar de la relativa hipercalcemia fetal, ejerce un mecanismo de retroalimentación "negativa" que regula la secreción de HPT mediante la concentración de calcio que trabaja con un alto "punto de equilibrio" en el feto, de tal forma que la supresión de la secreción de HPT en el feto requiere de concentraciones de calcio en el suero más altas que las requeridas después del nacimiento. Ambas, la HPT y la PrHPT pueden tener un papel muy importante en el transporte de calcio, y la PrHPT puede significativamente contribuir a la bioactividad de PrHPT en el suero fetal.

Péptido relacionado a la hormona paratiroidea

Bioquímica y metabolismo. Los genes del péptido relacionado a la hormona paratiroidea (PrHPT) y de la hormona paratiroidea son miembros de la misma familia genética; la fracción amino terminal de la PrHPT tiene la misma secuencia homóloga de 8 aminoácidos



con la fracción de HPT aminoterminal. La PrHPT también es equipotente a la HPT en los bioanálisis citoquímicos y en la síntesis bioquímica *in situ*.^{ref(723)} La síntesis de HPT está restringida a las glándulas paratiroides en los sujetos normales, pero el RNA mensajero de PrHPT está distribuido ampliamente en los tejidos normales, incluyendo la piel, tiroides, médula ósea, hipotálamo, pituitaria, corteza adrenal, médula adrenal, y el estómago. Varios estudios sugieren que la PrHPT puede tener un papel fisiológico significativo. Uno de los principales sitios de producción de este péptido es el tejido mamario lactante, y la PrHPT está presente en grandes cantidades en la leche.

Mecanismo de acción. En los adultos normales, las concentraciones de PrHPT van desde menos de 2 hasta 5 pmol/litro. La infusión de PrHPT causa elevación en el suero de la concentración de 1,25-dihidroxitamina D y un aumento en la formación de estos parámetros en el hueso.^{refs(724)} La PrHPT puede jugar un papel temporal en casos de hipercalcemia de la malignidad. Es posible que HPT y PrHPT actúen en el mismo receptor óseo para causar aumento de la resorción y formación ósea y en la hipercalcemia y la hipofosfatemia.^{ref(725)} La PrHPT, producida en las glándulas paratiroides fetales, puede ser responsable de la estimulación del transporte de calcio.^{refs(726)}

Calcitonina (CT)

La calcitonina,^{ref(727)} se descubrió en 1962, y se conoce generalmente como una de las tres hormonas (junto con vitamina D y hormona paratiroidea) responsables del control de la homeostasis de calcio y de fósforo. A pesar de los grandes esfuerzos de los investigadores, aun no se ha elucidado un papel definitivo del efecto de la calcitonina en la homeostasis del calcio. Ni la deficiencia de calcitonina ni el exceso de la misma están claramente asociados con las enfermedades óseas o con las alteraciones en la homeostasis del calcio.

Localización, bioquímica y metabolismo. La calcitonina se produce en las células C-parafoliculares de la glándula tiroides, de la glándula pituitaria, en el tracto gastrointestinal, y también en el hígado puede producirse esta hormona.^{ref(728)} La calcitonina se secreta en forma precursora, con un peso molecular de 15000 daltones, que se rompe en el polipéptido calcitonina de 32 aminoácidos, el cual tiene un peso molecular de 3500 daltones.^{ref(729)} La concentración de calcitonina normal es menor a 100 pg/mL. La calcitonina es rápidamente excretada, con una vida media de 10 minutos después de su administración intravenosa.^{ref(730)} La excreción es predominantemente renal, y las concentraciones de calcitonina en el suero están aumentadas en pacientes con insuficiencia renal.^{ref(731)}

Efectos biológicos. El principal efecto biológico reconocido de CT es contrarrestar la acción de HPT en varios sitios en los órganos del cuerpo humano. Los efectos biológicos de la calcitonina pueden dividirse en aquéllos relacionados a la homeostasis del calcio y del fósforo y en aquéllos relacionados con la función gastrointestinal. La administración intravenosa de calcitonina causa una disminución abrupta en las concentraciones de calcio y fósforo. Esto se debe a que los efectos de calcitonina son tanto en el hueso como en el riñón. La calcitonina altera la función celular al aumentar la producción intracelular de AMPc.^{ref(732)} Los receptores específicos para CT se han demostrado en los osteoclastos óseos, y la CT antagoniza la resorción ósea mediada por HPT al suprimir la actividad osteoclástica. Consecuentemente, la CT disminuye el flujo de calcio y de fósforo del hueso a la circulación disminuyendo paralelamente la excreción urinaria de hidroxiprolina al disminuir la resorción ósea. La



calcitonina también disminuye la reabsorción renal de calcio, fósforo, sodio, potasio y magnesio.^{ref(733)} La CT también actúa sobre el metabolismo de la vitamina D; aumenta la producción de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ en el túbulo renal. Estos efectos descritos tanto en el hueso como en el riñón se han producido utilizando concentraciones farmacológicas de calcitonina.

En el feto humano, las células C de la tiroides parecen estar bien desarrolladas en la semana 14 de gestación. Sin embargo, el papel de CT en la homeostasis mineral y ósea no está bien elucidada aun. La calcitonina no cruza la placenta, y, junto con HPT, la función de CT fetal puede ser autónoma con respecto a la madre y jugar un papel en la mineralización ósea fetal.

Regulación de la secreción de calcitonina. La secreción de calcitonina está influenciada por la concentración sérica de calcio; las hormonas gastrointestinales, gastrina, colecistoquinina y glucagon, así como por los esteroides sexuales. La liberación de calcitonina se afecta primeramente por la concentración de calcio ionizado sérico y se estimula por la hipercalcemia y se inhibe por la hipocalcemia.^{ref(734)} La vitamina D tiene un efecto inhibitorio sobre la expresión genética de CT y la secreción de CT; en la células C parafoliculares se han demostrado receptores para $1,25(\text{OH})_2\text{D}$. Las concentraciones de calcitonina pueden estar altas en las mujeres embarazadas y lactantes con respecto a los controles. Los hombres pueden tener concentraciones circulantes de calcitonina más altas que las mujeres.^{ref(735)}

El péptido relacionado con el gen de calcitonina (CGRP)

CGRP es otro producto de traducción del gen de calcitonina. CGRP es un péptido de 37 aminoácidos cuya secuencia de aminoácidos muestra una baja homología con calcitonina. Los receptores para este péptido están localizados primeramente en el tejido neural y la biosíntesis de CGRP está confinada primeramente a los tejidos neurales. Es probable que el papel primario de este péptido sea de neurotransmisión. No se conoce hasta ahora si la CGRP comparte actividad calciotrópica con calcitonina.

Enfermedades Óseas

Las enfermedades de la homeostasis del calcio, fósforo, vitamina D y de la hormona paratiroidea frecuentemente producen *osteopenia*, término general que indica la cantidad de hueso desmineralizado presente en los rayos X. Muchas enfermedades están asociadas con osteopenia^{ref(736)} (ver cuadro abajo). La condición histopatológica del hueso en la osteopenia puede presentar una formación disminuida del osteoide (matriz ósea), disminución de la mineralización del osteoide, o un aumento de la resorción ósea.^{ref(737)} Estas categorías histopatológicas correlacionan con el diagnóstico clínico de osteoporosis, osteomalacia, u osteitis fibrosa, respectivamente. La osteopenia puede presentarse en el síndrome de fractura por compresión en los adultos y en las fracturas o fallas en el crecimiento en los niños. El hueso trabecular es afectado más frecuentemente que el hueso cortical, por lo que las fracturas ocurren más frecuentemente en las vértebras, el cuello del fémur, y las terminaciones distales a lo largo de los huesos, donde el hueso trabecular es más abundante. Los diagnósticos específicos que se hacen sobre el hueso osteopénico se hacen histológicamente,



ocasionalmente anomalías de laboratorio características permiten diferenciar entre la osteoporosis, la osteomalacia y la osteitis fibrosa (Tabla 28-1).

Osteoporosis

La osteoporosis se caracteriza por un balance alterado entre la resorción ósea y la formación ósea, lo cual da como resultado una disminución progresiva de la masa ósea y una disminución en la cantidad de hueso normalmente mineralizado; siendo la relación mineral-colágeno normal. La mayor secuela es la fragilidad del hueso y la predisposición a la fractura, particularmente la fractura por contusión espino-vertebral, fractura de la cabeza del cuello del fémur, y fractura del radio distal, las cuales pueden ocurrir ya sea espontáneamente o en respuesta a un trauma menor. La osteoporosis primaria es frecuentemente diagnosticada en hombres y mujeres de edad avanzada (osteoporosis senil) y en mujeres posmenopáusicas. Ocurre sólo raramente durante la niñez como una enfermedad idiopática y puede ser acompañada de ciertas enfermedades sistémicas (**ver cuadro abajo**). Los factores ambientales que predisponen en la pérdida de hueso y en la osteoporosis incluyen el tabaquismo, una ingesta de calcio crónica baja en la dieta, una vida sedentaria, el exceso de ingesta de cafeína, una dieta alta en proteína animal alta en ácidos y la ingesta de alcohol.^{ref(738)}

Osteoporosis senil.

La pérdida de hueso normal ocurre durante el envejecimiento. Este proceso comienza a los 50 años de edad en las mujeres y a los 65 o 70 años de edad en el hombre y resulta en una pérdida del 0.5% de la masa ósea total por año y aproximadamente del 20% durante toda la vida.^{ref(739)} Los pacientes con osteoporosis senil experimentan una pérdida acelerada del 1% al 2% por año, con síntomas de osteoporosis que comienzan cuando pierden un 30% de la masa ósea. Se ha sugerido que la osteoporosis es una parte natural del proceso de envejecimiento manifestado en forma temprana en estas personas que tienen una masa ósea menor acumulada durante su vida adulta temprana. Las causas de osteoporosis senil son desconocidas en su mayoría. Las alteraciones hormonales que ocurren durante la senescencia estimulan la pérdida de hueso (**ver cuadro abajo**). La disminución de las concentraciones de calcitriol encontradas en personas ancianas^{ref(740)} probablemente resultan de una respuesta de síntesis fallida a la hormona paratiroidea.^{ref(741)} Además, las concentraciones de hormona paratiroidea aumentan^{ref(742)} y las concentraciones de calcitonina disminuyen^{ref(743)} con la edad. El efecto neto de estas alteraciones hormonales es la disminución de la absorción intestinal de calcio y el aumento de la resorción ósea.

También parece tener un papel importante la deficiencia de vitamina D como causa de osteoporosis. Cerca del 60% de la gente anciana viviendo en casas de asilo para ancianos desarrollan deficiencia de vitamina D al término del invierno; también un número significativo de ancianos con fractura de cadera (40% en los hombres y 30% en las mujeres) son deficientes en vitamina D. Hay evidencia que indica que la gente anciana con osteoporosis cursa con un defecto renal en la actividad de 1-alfa-hidroxilasa con el envejecimiento e hiperparatiroidismo secundario por deficiencia en vitamina D.

Osteoporosis posmenopáusica.

La osteoporosis posmenopáusica, la cual se presenta en mujeres a una edad temprana

mas que la osteoporosis senil, se debe a una deficiencia de estrogénos. Las mujeres que la presentan tienen disminuidas la absorción intestinal de calcio y concentraciones bajas de calcio sérico comparadas con sus parejas apareadas por edad.^{ref(744)} Aunque las concentraciones de HPT son normales cuando se comparan con controles con concentración de calcitriol normal, estas están bajas cuando se ven en un contexto de deficiencia de calcitriol.^{ref(745)} El suplemento con estrógenos aumenta la absorción de calcio y de calcitriol sérico y las concentraciones de HPT.^{ref(746)} Esta información se ha interpretado como una indicación de que la deficiencia de estrogénos produce osteoporosis postmenopáutica al causar resorción ósea, la cual libera calcio al espacio extracelular y entonces suprime la secreción de HPT, la síntesis de calcitriol y absorción intestinal de calcio (Fig. 28-6). Se ha sugerido que la deficiencia de magnesio puede jugar un pael en la osteoporosis posmenopáutica.

Aproximadamente el 30% de las mujeres blancas posmenopáuticas por lo menos tienen una fractura. Sin embargo, la verdadera incidencia de estas fracturas es difícil de estimar porque un gran numero de fracturas vertebrales permanecen asintomáticas. Las fracturas de cadera por osteoporosis ocurren en la tercera y cuarta década después de la menopausia; ellas son dos veces más comunes en las mujeres que en los hombres. Para los 90 años de edad, cerca del 33% de las mujeres y por lo menos el 17% de los hombres presentan una fractura de cadera.

Osteoporosis juvenil idiopática.

La osteoporosis juvenil idiopática es una forma rara de desmineralización ósea que afecta a los niños en la pubertad. Las características clínicas se manifiestan como fracturas de los huesos largos y de las vértebras, además hay dolor óseo. Está caracterizada por una recuperación espontánea después de la pubertad. En casos severos, fracturas características de la compresión de la metáfisis en las extremidades bajas ocurren después de la compactación del hueso recién formado, una forma patognomónica de esta enfermedad. La etiología de esta enfermedad se desconoce hasta la fecha. Algunos pacientes han cursado por deficiencia transitoria de calcitriol, la cual correlaciona con el curso clínico de la enfermedad. El tratamiento de estos pacientes con calcitriol reduce la incidencia de fracturas óseas y aumenta la mineralización ósea al año. Otros pacientes pueden tener un balance negativo de calcio, disminución de 25(OH)D y aumento de 1,25(OH)₂D o una posible deficiencia de calcitonina.

Osteoporosis inducida por corticosteroides.

Hay una pérdida de hueso substancial y un aumento considerable de fracturas patológicas en pacientes tratados con corticosteroides por períodos prolongados. El mecanismo por el cual los esteroides inducen la resorción ósea no se conoce completamente. Los corticosteroides ejercen efectos inhibitorios sobre la función osteoblástica, la cual está significativamente reducida en pacientes tratados con esteroides. La terapia con corticosteroides reduce la absorción intestinal de calcio y de fósforo.

Hipertiroidismo.

Ambos, la deficiencia y una excesiva circulación de hormona tiroidea pueden tener una secuela en el hueso deteriorante. El principal papel de la hormona tiroidea es aumentar el numero de unidades óseas de remodelamiento, y por ello aumentar la actividad de remodelamiento. La tirotoxicosis causa aumento de la resorción ósea y disminución del



mineral óseo.

Osteomalacia

La osteomalacia es diagnosticada cuando el hueso contiene cantidades normales de osteoide que no mineralizan. Cuando esto se observa en un niño en crecimiento, la osteomalacia es llamada *raquitismo*. Los términos *raquitismo* y *osteomalacia* son usados indistintamente en este capítulo. Las principales causas de osteomalacia se listan en el **cuadro de la pág. 537** y sus anormalidades bioquímicas asociadas se resumen en la Tabla 28-2.

Clínicamente, los primeros síntomas de raquitismo en la infancia pueden ser tetania hipocalcémica o (apoplejia), particularmente por falta de suplemento de vitamina D, infantes exclusivamente alimentados por leche materna, y en infantes recién nacidos con raquitismo congénito de madres osteomaláticas deficientes en vitamina D. Una infección aguda puede precipitar la tetania hipocalcémica, posiblemente al movilizar fosfato del hueso a la circulación y por lo tanto disminuyendo la concentración de calcio del suero. En los primeros 6 meses de edad, huesos anormales se han visto a través de rayos X. La muñeca y la rodilla son los más útiles en demostrar los signos de raquitismo incipientes. Los "pulmones raquíuticos" indican una caja torácica hueca, con un defecto en la ventilación pulmonar secundaria. Estos casos ocurren en el infante muy joven, particularmente entre infantes pretérmino. Sobrepasando la infancia, el aumento de peso agrava los cambios en el raquitismo particularmente en las vértebras, la pelvis, y los huesos de los miembros inferiores, resultando en deformidades de la espina y de la pelvis que causan al andar que las piernas se arqueen, o "rodillas en nudo". Frecuentemente en los niños con raquitismo hay debilidad muscular e hipotonía que involucra grupos de los músculos proximales en el raquitismo y contribuyen a las piernas en arco, protuberancia del abdomen, e ineficiencia de la ventilación pulmonar. La debilidad muscular se cree que es causada por una disminución de la ingesta de calcio por los miocitos.

Osteomalacia por deficiencia en vitamina D.

Históricamente, la causa más común de osteomalacia fue *la deficiencia de vitamina D* causada por una combinación de insuficiente exposición a la luz del sol y una inadecuada ingesta dietética de vitamina D en los alimentos. [ref\(747\)](#) Las concentraciones de calcidiol en el suero, las cuales reflejan la cantidad adecuada de vitamina en el cuerpo, estén bajas en la osteomalacia. La suplementación de los alimentos con vitamina D ha virtualmente eliminado el problema en los países industrializados, pero aún se puede observar en naciones subdesarrolladas, particularmente entre la gente de piel oscura porque el pigmento de la piel disminuye la producción de colecalciferol, la cual normalmente ocurre después de la exposición a la luz ultravioleta. También se ha encontrado en infantes exclusivamente alimentados por leche materna y en adultos estrictamente vegetarianos, aún en países desarrollados. Estos individuos tienen limitada exposición al sol y no ingieren leche suplementada con vitamina D.

Las alteraciones en el metabolismo de la vitamina D que pueden producir raquitismo fluctúan desde las condiciones de ingesta insuficiente o producción de colecalciferol hasta alteraciones en su activación por el hígado y el riñón. Generalmente se puede predecir la respuesta bioquímica a un déficit de calcitriol (ver Fig. 28-4). La absorción intestinal de calcio disminuirá y se produce hipocalcemia. Esto estimula la liberación de HPT (hiperparatiroidismo secundario), la cual moviliza calcio del hueso y aumenta la excreción de

fósforo por el riñón. Inicialmente, las concentraciones de calcio séricas se mantienen a expensas de la resorción del hueso, pero a medida que se produce deprivación mineral, la hipocalcemia ocurre. La hipofosfatemia se presenta porque hay un aumento de la pérdida urinaria de fósforo. Así, las características de las anomalías del hueso que están asociadas al aumento de la deficiencia de calcitriol son la hipocalcemia, la hipofosfatemia y el hiperparatiroidismo (Tabla 28-2). Además, se observa hiperfosfaturia, aminoaciduria, enfermedad del hueso raquítrico y elevada concentración de fosfatasa alcalina.

La osteomalacia resulta también de la deficiencia de fósforo. En este caso, la baja concentración de fósforo intracelular debe estimular la síntesis de calcitriol, la cual aumentará tanto la absorción intestinal como renal de fosfatos. Las concentraciones de calcio sérico y HPT no deben afectarse (Tabla 28-2).

Osteomalacia secundaria a alteraciones gástricas. Pacientes con enfermedades gastrointestinales, particularmente aquéllos con enfermedad hepatobiliar, a menudo desarrollan osteomalacia. La vitamina D es soluble en grasa y requiere de los ácidos biliares para su absorción (ver Capítulo 30). Los pacientes con enfermedad hepatobiliar tienen niveles bajos de calcidiol, alterada la producción de calcidiol por el hígado, y aumentada el metabolismo de calcitriol. La osteopenia también se puede observar después de cirugía gástrica, aunque no se entiende su patogénesis.

Raquitismo hepático. La enfermedad hepatobiliar predispone al raquitismo, aparentemente porque disminuye la actividad de la 25-hidroxilasa de la absorción de vitamina D y disminuye la circulación enterohepática de la 25(OH)D. La mala absorción de vitamina D es probablemente un factor importante en la patogénesis del raquitismo hepático. Bioquímicamente, las concentraciones de 25(OH)D y 1,25(OH)₂D están bajas. Clínicamente, los signos de raquitismo se imponen sobre la enfermedad hepática primaria. Los niños con hepatitis y los niños que requieren prolongada alimentación parenteral pueden desarrollar varios grados de disfunción hepática y raquitismo secundario.

Osteomalacia secundaria a tratamiento con anticonvulsivantes. El raquitismo puede ocurrir en el 30% de los niños recibiendo tratamiento con anticonvulsivantes, como son la fenitoina (Dilantin) y el fenobarbital, que favorecen el sistema enzimático hepático microsomal de la oxidasa. [ref\(748\)](#) Este sistema enzimático, cuando se estimula, convierte el calcidiol a su metabolito inactivo polar, lo que resulta en deficiencia de calcidiol. Otros factores bioquímicos que afectan la terapia pueden incluir a la hipocalcemia, la hipofosfatemia, la hipocalciuria y las concentraciones elevadas de fosfatasa alcalina y HPT. Además, los anticonvulsivantes inhiben al calcitriol dependiente de la ingesta de calcio intestinal.

Osteomalacia dependiente de vitamina D (tipo I y II).

Desde que los alimentos son suplementados con vitamina D, se ha hecho aparente que las dosis antirraquítricas normales de los análogos de la vitamina D fallan para atacar el raquitismo de una subpoblación de pacientes raquítricos. Un grupo de estos pacientes tienen el clásico signo y síntoma de la deficiencia en vitamina D, incluyendo la hipocalcemia infantil temprana, la hipofosfatemia y la tetania, pero estos pacientes requieren de más de 100 veces la ingesta normal de vitamina D para detener su raquitismo. Este grupo de pacientes con raquitismo dependiente de vitamina D ha sido recientemente clasificado en dos subgrupos con distinta bases patofisiológicas.

Los pacientes con raquitismo dependiente de vitamina D tipo I tienen las



anormalidades características del raquitismo deficiente en vitamina D, pero sus concentraciones de calcidiol en suero son normales y carecen de calcitriol circulante.^{ref(749)} El defecto supuesto es una anormal o carente actividad de la 1- α -dihidroxilasa. Clínicamente, la enfermedad se presenta antes de los dos años de edad, pero más a menudo en los primeros 6 meses de vida. Una forma esporádica de la enfermedad se ha descrito menos comúnmente, y su presencia es en la infancia tardía o en la adolescencia. La osteomalacia de estos pacientes se presenta cuando dosis fisiológicas de calcitriol se administran.

Los pacientes con raquitismo dependiente de vitamina D tipo II tienen niveles de calcidiol y calcitriol normales y son resistentes a las dosis fisiológicas de calcitriol. La causa de la enfermedad es una resistencia terminal del órgano al efecto de la 1,25(OH)₂D debido a un defecto en el sistema efector del receptor a calcitriol, y debe ser llamado "raquitismo resistente al calcitriol [1,25(OH)₂D]". Clínicamente, esta enfermedad se manifiesta como raquitismo y osteomalacia, y más comúnmente antes de los 2 años de edad, y raramente después durante la vida. Bioquímicamente, estos pacientes tienen concentraciones bajas de calcio y fósforo, concentración normal de 25(OH)D y concentraciones elevadas de 1,25(OH)₂D. Ambas formas de raquitismo dependiente de vitamina D se heredan en un patrón autosomal recesivo.

Hay cinco clases de receptores de calcitriol defectuosos: (1) Defecto en la región de la unión hormona-receptor. (2) Afinidad de la hormona-receptor normal, acompañado de reducción del número de receptores los sitios de unión (10% del normal). (3) La afinidad en la unión hormona-receptor está disminuida de veinte a treinta veces más mientras el número de sitios del receptor es normal. (4) Un defecto en la localización nuclear. De esta forma, el calcitriol no localiza el núcleo celular. (5) Disminución de la afinidad del complejo hormona-receptor al DNA. Los defectos intracelulares categorizados 1,2, y 5 no responden a la terapia con altas dosis de vitamina D. En contraste, los defectos intracelulares tipo 3 y tipo 4 pueden ser curados con altas dosis de vitamina D. El diagnóstico prenatal de esta enfermedad se conoce ahora y se indica a las familias de alto riesgo.

Osteomalacia resistente a vitamina D.

Los pacientes con *raquitismo resistente a vitamina D* carecen de la mayoría de los marcadores asociados con los pacientes raquíticos. El fósforo sérico está severamente disminuido, mientras que las concentraciones de calcio sérico pueden ser normales o reducidas. La concentración de HPT en suero es normal o aumentada y la concentración sérica de 1,25(OH)₂D es normal o disminuida. Esta alteración es causada por un defecto congénito de la reabsorción de fosfato en los túbulos renales, resultando en una fosfaturia e hipofosfatemia masiva. El gen defectuoso responsable ha sido ubicado en el brazo corto del cromosoma X humano. Dado que las bajas concentraciones intracelulares de fósforo son un estímulo importante para la síntesis de calcitriol, las concentraciones de calcitriol sérico deberían estar elevadas en este padecimiento. Sin embargo, cuando éstas se miden, se ha encontrado que las concentraciones de calcitriol sérico son bajas o en el rango bajo de las normales.^{36, 39} Este hallazgo sugiere un segundo defecto potencial de esta condición, esto es, la disfunción de la enzima renal 1- α -hidrolasa. El raquitismo resistente a vitamina D puede heredarse con un patrón recesivo ligado al sexo o autosomal dominante. El tipo más frecuente es el patrón concomitante ligado al sexo y afecta a los hombres. Los pacientes con raquitismo



resistente a vitamina D han sido tratados tradicionalmente con colecalciferol y suplementos de fosfatos

Raquitismo por deficiencia en calcio. También llamado *raquitismo osteopénico*, esta forma de osteomalacia ocurre cuando la dieta es baja en calcio o cuando la biodisponibilidad al calcio está reducida. Los niños que siguen dietas vegetarianas estrictas o dietas altas en cereales están en riesgo de desarrollar raquitismo. Algunos de estos niños tienen signos clínicos y bioquímicos de deficiencia en vitamina D, atribuidas a la unión de la vitamina D a los fitatos dietéticos en la pared del intestino.

Clínicamente, los niños afectados tienen signos de raquitismo con rodillas en "nudo", piernas en arco o deformidades "wind-swept", pero no debilidad muscular. Los signos radiológicos corresponden a hallazgos clínicos con cambios en el raquitismo (ver arriba). El patrón histológico óseo revela signos de osteomalacia y de hiperparatiroidismo secundario. Los signos bioquímicos de raquitismo calciopénico incluyen hipocalcemia e hipocalciuria, concentraciones de 25(OH)D en suero normal, fosfatasa alcalina en suero elevada y calcitriol en suero elevado.

Osteopenia inducida por hiperalimentación. La alimentación parenteral prolongada (TPN) se ha asociado con osteopenia y desmineralización ósea. El principal signo visto en esta enfermedad ósea metabólica es la hipercalcemia. Varios factores se han visto implicados en la causa de la hipercalcemia incluyendo la infusión cíclica con soluciones de TPN, sulfuros conteniendo aminoácidos ácidos, infusiones de dextrosa hipertónica, la cual resulta en hiperinsulinemia y disminución de la resorción tubular de calcio, acidosis y poco fosfato en las soluciones de infusión. La hipercalcemia puede ser aminorada por la suplementación de fosfato.

La hiperalimentación con soluciones parenterales conteniendo aluminio son responsables de una enfermedad ósea metabólica peculiar caracterizada por la baja formación de hueso. El grado de la acumulación de aluminio en el hueso correlaciona con la disminución de la formación ósea.

Otras causas de osteomalacia. La acidosis crónica causa osteomalacia, hipercalcemia, e hiperfosfatemia debido a la neutralización de ácidos por el hueso con subsecuente liberación del contenido mineral. Los pacientes con síndrome de Fanconi renal tienen disminuida la reabsorción de bicarbonato a nivel del túbulo proximal (resultando en acidosis crónica), fósforo, glucosa y aminoácidos. La osteomalacia puede ser severa debido a la acidosis crónica y a la severa hipofosfatemia. Además, como parte de la tubulopatía proximal, debe haber actividad anormal de la enzima 1-alfa-hidroxilasa renal.^{ref(750)}

Suficiente sustrato debe ser suministrado en la dieta para una adecuada mineralización ósea. Una tardía mineralización ósea comúnmente ocurre en niños prematuros de muy bajo peso al nacimiento, quienes son alimentados por leche en fórmula o leche materna,^{ref(751)} ambas de las cuales contienen cantidades insuficientes de calcio y de fósforo para una rápida mineralización en los niños prematuros.

Osteomalacia inducida por drogas. La prolongada administración de *heparina* se ha asociado con osteoporosis y disminución de la densidad ósea. El incidente de osteopenia inducida por heparina no se conoce. Parece que el individuo tiene que recibir una dosis de por lo menos 15,000 unidades/día durante 6 meses antes de que la osteopenia ocurra. Los síntomas son inespecíficos y básicamente manifiestan dolor de espalda y fracturas vertebrales y son reversibles una vez que se suspende la heparina. Se ha visto que disminuye la actividad

osteoblástica en animales y aumenta la resorción ósea en humanos. Consecuentemente, el prolongado uso de este agente puede inducir osteopenia.

Osteitis fibrosa

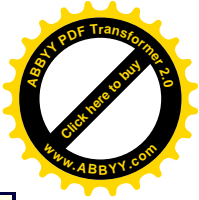
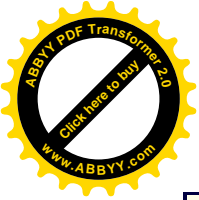
La osteitis fibrosa es la lesión ósea patológica producida por un exceso de la secreción de la hormona paratiroidea. Se observa primeramente en dos condiciones, en el hiperparatiroidismo primario y en la insuficiencia renal crónica. La enfermedad ósea es de menor significancia en el hiperparatiroidismo primario porque la remoción de las glándulas paratiroides con cirugía cura la enfermedad. La condición patológica en el hiperparatiroidismo secundario asociado a insuficiencia renal crónica es más complicado y menos susceptible al tratamiento. Los pacientes urémicos frecuentemente sufren de una severa enfermedad ósea.

La compleja anormalidad ósea asociada con la insuficiencia renal crónica se conoce como *osteodistrofia renal*. Hay dos formas histopatológicas distintas de osteodistrofia renal, la osteomalacia y la osteitis fibrosa (**ver cuadro**), las cuales frecuentemente coexisten en el mismo paciente. La osteomalacia es probablemente causada por una disminución de la síntesis de calcitriol secundaria a la enfermedad del parénquima renal. Las concentraciones séricas de calcitriol y de 24,25-dihidroxivitamina D están disminuidas en ambos niños y adultos con insuficiencia renal crónica, con concentraciones de calcidiol normal. [ref\(752\)](#) Los factores que contribuyen al hiperparatiroidismo secundario a enfermedad renal incluyen (1) la disminución de la excreción de fósforo e hiperfosfatemia, la cual directamente disminuye la síntesis renal de calcitriol (Fig. 28-7 y 28-8); (2) la disminución de la actividad de la hidroxilasa renal debida a un daño renal; (3) la alta concentración del punto de secreción de HPT en la uremia es posiblemente debido a una disminución del número de receptores de vitamina D en la célula paratiroidea; (4) la hipocalcemia; y (5) una resistencia esquelética a HPT.

Enfermedad de Paget

La enfermedad de Paget es una alteración del metabolismo óseo caracterizada por un aumento de la resorción osteoclastica ósea seguida de una alteración en la formación ósea. La incidencia de esta enfermedad es difícil de determinar debido a que la mayoría de los pacientes afectados son asintomáticos. La incidencia de la enfermedad de Paget varía con la edad y la localización geográfica. Es más común entre los ancianos que en los adultos de mediana edad. En la autopsia de una serie de personas de más de 40 años de edad, 3% de este grupo está afectado. La historia familiar es positiva en 14% de los casos. Los hombres son más susceptibles a tener la enfermedad que las mujeres (3:2). Esta enfermedad ocurre más frecuentemente entre gente con antecedentes Europeos. Es poco común entre Escandinavos, Asiáticos y Africanos negros. La causa de la enfermedad se desconoce.

El patrón histológico de los pacientes con la enfermedad de Paget presenta tres etapas. En la etapa temprana de la enfermedad, predomina la resorción y la médula ósea se reemplaza con gran cantidad de tejido conectivo vascular fibroso. En la segunda fase de la enfermedad, la formación ósea predomina. El hueso pagético está cubierto de fibras, de hueso trabecular denso. En la fase final la escala de resorción ósea declina y continúa la producción ósea que produce un hueso denso y duro. La mayor cantidad de resorción ósea que ocurre inicialmente produce una alta concentración de hidroxiprolina urinaria, y la subsecuente rápida escala de formación ósea resulta en una dramática elevación de las concentraciones de fosfatasa alcalina. La concentración de calcio y fósforo son normales. Sin embargo, fracturas patológicas



ocurren y son tratadas inmovilizando a los pacientes. La hipocalcemia que ocurre frecuentemente debido a la inmovilización aumenta la escala de resorción ósea. La enfermedad de Paget es tratada satisfactoriamente con calcitonina, la cual inhibe la resorción ósea osteoclástica.[ref\(753\)](#)

Enfermedad ósea hereditaria

Hipofosfatasia.

La hipofosfatasia es una rara enfermedad hereditaria caracterizada por una reducción generalizada en la actividad de la fosfatasa alcalina en el hígado, el hueso y el tejido renal. La actividad de las isoenzimas de la fosfatasa alcalina placentaria e intestinal permanecen normales. La enfermedad ocurre en todas las razas pero especialmente es común entre Menonitas en Canadá, donde la incidencia está por encima del 1 en 100,000 nacimientos. Clínicamente, la enfermedad afecta el hueso y la dentición y los rangos van desde una forma severa y letal en el útero hasta una enfermedad asintomática en el adulto. Se conocen cuatro formas clínicas de la enfermedad: *forma perinatal (letal)*, comúnmente asociada con el nacimiento (mortinato) y el polihidramnios; *la forma infantil*, usualmente vista durante los primeros 6 meses de vida; *la forma en la niñez*; y *la forma adulta*, usualmente presente en la edad media.

Osteogénesis imperfecta.

La condición de osteogénesis imperfecta es una enfermedad hereditaria del tejido conjuntivo que involucra la síntesis anormal de las fibrillas del colágeno tipo I, la proteína más abundante de la matriz ósea. Las manifestaciones clínicas primarias de esta enfermedad son una pronunciada fragilidad ósea, osteopenia generalizada y fracturas recurrentes en respuesta a un traumatismo ligero. La pérdida del oído, la cual ocurre en cerca de un 50% de los pacientes con menos de 30 años de edad, es a menudo conductiva y raramente es sensoneural. La patogénesis de la enfermedad involucra mutaciones defectuosas en los genes que codifican para las cadenas pro-alfa-1 y pro-alfa-2 del colágeno tipo I, resultando en fragilidad ósea.

Osteopetrosis.

La osteopetrosis incluye a un grupo de enfermedades caracterizadas por una falla en la resorción ósea mediada por los osteoclastos. El mecanismo de la malfunción osteoclastica es pobremente entendido. La enfermedad se clasifica en ocho tipos de acuerdo a los factores clínicos y genéticos. Las dos formas principales de osteopetrosis son un tipo común más benigno, a menudo asintomático e inherente a un modo autosómico dominante, y la forma rara maligna, la cual típicamente se presenta en la infancia y en la niñez y es inherente a un modo autosómico recesivo. Las formas raras de osteopetrosis pueden estar asociadas con acidosis tubular renal, deficiencia de la anhidrasa carbónica o enfermedad del depósito neuronal.

Cambio del Compuesto Analizado en la Enfermedad

Vitamina D

La concentración de los metabolitos de la vitamina D puede estar alterada en una variedad de enfermedades (**ver cuadro**). La disminución de la concentración resulta de una ingesta deficiente, una regulación metabólica defectuosa o un aumento en la excreción. Las



concentraciones de calcidiol están bajas en pacientes con una deficiencia a la exposición al sol o a una baja en la ingesta de alimentos que contengan vitamina D. Los pacientes que reciben drogas anticonvulsivantes convierten el calcidiol en la forma inactiva de metabolitos polares.^{ref(754)} La producción de calcidiol es anormal en pacientes con enfermedad hepática.^{ref(755)} La actividad de la 1α -hidroxilasa renal, ausente o inactiva y una secundaria concentración sérica baja de calcitriol estén asociados con raquitismo tipo I dependiente de vitamina D,^{ref(756)} con osteoporosis posmenopausica y senil,^{ref(757)} hipoparatiroidismo,^{ref(758)} pseudohipoparatiroidismo,^{ref(759)} raquitismo resistente a vitamina D,^{ref(760)} e insuficiencia renal crónica.^{ref(761)} Pacientes con síndrome nefrótico tienen concentraciones bajas de tanto calcidiol como calcitriol debido a una pérdida urinaria de ambos metabolitos, así como de la proteína que transporta la vitamina D (proteína transportadora de vitamina D) a la cual se encuentran unidas.^{ref(762)}

Las concentraciones altas de calcidiol resultan del aumento de la ingesta exógena o del aumento de la producción endógena secundaria a una alta exposición a la luz del sol poco usual. Las concentraciones altas de calcitriol ocurren en estados fisiológicos con alta ingesta de calcio como por ejemplo en el crecimiento^{ref(763)} y en el embarazo y la lactancia.^{ref(764)} Altas concentraciones de calcitriol también se ven en la sarcoidosis, en la cual se presenta una fuente extrarrenal en la producción de calcitriol, y en el hiperparatiroidismo, en el cual las concentraciones de HPT en el suero, el principal estímulo de la producción de calcitriol, están elevadas.

Hormona paratiroidea

Hipoparatiroidismo.

Hipoparatiroidismo primario idiopático. El *hiperparatiroidismo idiopático* describe la condición de la disminución de HPT cuya causa no se conoce. En el pseudohipoparatiroidismo, la producción de HPT está intacta, pero hay una resistencia a nivel de los órganos diana a HPT; en otras palabras, la HPT, aunque presente, no ejerce sus acciones biológicas debido a que no responden los órganos diana. En la terminología común, debe haber un defecto en el "receptor" para HPT. Otra forma de describir el hipoparatiroidismo idiopático sería hipoparatiroidismo deficiente de hormona, y el pseudohipoparatiroidismo sería descrito como *suficiente-hormona, hipoparatiroidismo receptor-deficiente* (Fig. 28-9). El hipoparatiroidismo clásico se manifiesta generalmente en la niñez con hipocalcemia e hiperfosfatemia.

Hipoparatiroidismo secundario. El hipoparatiroidismo puede resultar de otras enfermedades. Inadvertidamente, la remoción quirúrgica de las paratiroides puede ocurrir durante la tiroidectomía. Ya que el magnesio es importante para la secreción de HPT, la deficiencia de magnesio puede dar hipoparatiroidismo. Un hipoparatiroidismo fisiológico interesante ocurre en los infantes. En el útero, la transferencia de calcio se activa y cruza la placenta, y las concentraciones de calcio séricas en el feto son extremadamente altas. Estas altas concentraciones de calcio parece que inhiben la función paratiroidea fetal. La persistencia de una inhibida función paratiroidea por un corto intervalo después del nacimiento parece ser la causa de la hipocalcemia en los primeros 3 días de vida, especialmente en los infantes prematuros.^{ref(765)}

El diagnóstico de hipoparatiroidismo se hace a partir de la presentación clínica de bajas



concentraciones de calcio y elevadas concentraciones de fósforo. Las concentraciones de HPT pueden estar bajas en el hipoparatiroidismo pero elevadas en el pseudohipoparatiroidismo. Para poder distinguir entre el hipoparatiroidismo idiopático y el pseudohipoparatiroidismo, se administra una infusión de HPT. Después de la infusión, las concentraciones de calcio y fósforo urinario y AMPc son medidas. Los pacientes con pseudohipoparatiroidismo pueden tener varios "grados de bloqueo" en la respuesta a HPT, a nivel del hueso o a varios "niveles" en el riñón.^{ref(766)} Los pacientes con hipoparatiroidismo son tratados con suplementos de sales de calcio y de calcitriol.

Hiperparatiroidismo

Hiperparatiroidismo primario. El hiperparatiroidismo primario a menudo se describe por estar relacionado con la hiperplasia o el adenoma de las paratiroides. En contraste con el hipoparatiroidismo, el cual comienza en la niñez, el hiperparatiroidismo se encuentra usualmente en el adulto. Como es esperado la acción fisiológica de HPT, excede las concentraciones de la hormona que resultan del aumento de las concentraciones de calcio en suero y disminución de las concentraciones de fósforo en suero. La desmineralización ocurre como una consecuencia de la acción lítica ósea de HPT y está asociada con las áreas de resorción excesiva (osteitis fibrosa, ver pág. 541). Muchos problemas clínicos están asociados con las altas concentraciones de calcio en el suero. Los principales sistemas orgánicos afectados adversamente por la hipercalcemia son los sistemas nervioso y el riñón.

Hiperparatiroidismo secundario. Las condiciones que están asociadas con la hipocalcemia crónica resultaran de la estimulación crónica de las paratiroides y del hiperparatiroidismo secundario. Los dos principales factores resultantes de la hipocalcemia crónica de causa no paratiroidea son la deficiencia de los metabolitos de la vitamina D y las altas cargas de fósforo. Cualquier deficiencia de la vitamina D o de sus metabolitos principales resultará en una disminución de la absorción intestinal de calcio y en hipocalcemia. La respuesta inicial a esta hipocalcemia será secundaria al hiperparatiroidismo secundario, la cual ayuda a mantener las concentraciones de calcio en el rango normal. Las altas cargas de fósforo ocurren con la infusión de fluidos conteniendo fósforo, la ingestión de leche con alto contenido de fósforo (como la leche de vaca dada al recién nacido), o la retención de fósforo por falla en los riñones. Las altas concentraciones de fósforo resultan en una disminución secundaria en las concentraciones de calcio en el suero. Con la disminución de la concentración de calcio en el suero hay un hiperparatiroidismo secundario compensatorio.^{ref(767)}

El diagnóstico de hiperparatiroidismo primario se basa en los hallazgos de calcio sérico alto, fósforo sérico bajo y altas concentraciones de HPT en suero. Sin embargo, no todos los pacientes con hiperparatiroidismo tendrán un aumento de la concentración de calcio o aumento de la concentración de HPT. La determinación de calcio ionizado en sangre puede proporcionar ayuda en el diagnóstico adicional ya que la fracción de calcio ionizada es el calcio activo fisiológicamente.

En el hiperparatiroidismo secundario, las concentraciones de calcio en el suero están bajas o normales debido a que la sobreactividad de las paratiroides resulta de un declive inicial del calcio sérico. Las concentraciones de fósforo estarían bajas excepto en situaciones donde haya una sobrecarga de fósforo, donde deberían estar altas. Las concentraciones de HPT deben estar elevadas en el hiperparatiroidismo secundario.



Calcio (ver pág. 549)

Hipercalcemia.

La hipercalcemia resultante del hiperparatiroidismo primario se ha descrito anteriormente. Otras causas de hipercalcemia se listan en el cuadro siguiente.

Hipercalcemia relacionada con tumor endócrino. La hipercalcemia puede ocurrir con alteraciones de los órganos endócrinos diferentes a las paratiroides. La sobre producción de la hormona tiroidea (tirotoxicosis) y la baja producción de corticosteroides (enfermedad de Addison o una suspensión abrupta de las hormonas esteroides) están asociadas con la hipercalcemia. Una amplia variedad de tumores parece que producen sustancias parecidas a HPT con actividad estimuladora de los osteoclastos, la cual resulta en hipercalcemia. La hipercalcemia y el hiperparatiroidismo están a veces asociadas con el *feocromocitoma* o con el síndrome de la neoplasia múltiple endócrina tipo II. El tumor pancreático *VIPoma* secreta el péptido vasoactivo intestinal (PVI), el cual causa una severa diarrea. Cerca del 50% de estos casos tienen hipercalcemia posiblemente porque el PVI induce la resorción ósea. El mecanismo de la hipercalcemia de la malignidad puede, en parte, ser el resultado de la producción de PrHPT (hipercalcemia humoral de la malignidad), de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ en el linfoma, de la linfoxina en el mieloma múltiple, o de otras sustancias que causen resorción ósea.

Enfermedades relacionadas con la vitamina A y con la vitamina D. La ingesta excesiva de vitamina A o de vitamina D puede resultar en hipercalcemia. La hipercalcemia puede ser un signo de enfermedades granulomatosas como la *tuberculosis* y la *sarcoidosis*, las cuales están asociadas con un metabolismo anormal de la vitamina D y con un aumento de los niveles en suero de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$. En la sarcoidosis, las concentraciones elevadas de calcitriol parecen ser la causa de la hipercalcemia. La vitamina A en altas dosis parece ser el efecto directo de la resorción ósea. La terapia en el raquitismo resistente a vitamina D o hipoparatiroidismo con altas dosis de vitamina D es una causa común de hipercalcemia. La hipercalcemia idiopática de los infantes se cree que está relacionada con las alteraciones del metabolismo de la vitamina D, posiblemente aumento a la sensibilidad a vitamina D. [ref\(768\)](#)

Causas iatrogénicas. La inmovilización de los pacientes, especialmente de los jóvenes adolescentes, resulta en una rápida movilización de calcio de los huesos que resulta en hipercalcemia. La lactancia causa un aumento transitorio de la resorción ósea e hipercalcemia secundaria, lo que se revierte durante el destete. En infantes recién nacidos posteriores a nacimientos traumáticos, una hipercalcemia curiosa puede ocurrir relacionada a la necrosis de la grasa subcutánea. El uso de los diuréticos tiazidas está clásicamente asociado con la hipercalcemia. Las *tiazidas* pueden directamente aumentar la liberación de calcio del esqueleto y promover la reabsorción tubular de calcio. La ingesta crónica de *litio* puede causar hiperparatiroidismo e hipercalcemia ligera e hipermagnesemia. La ingestión excesiva de leche y de álcali en el tratamiento de la úlcera péptica (síndrome de la leche alcalina) también resulta en hipercalcemia.

La hipercalcemia neonatal (con una concentración de calcio sérico $>$ a 110 mg/L o una concentración sérica de calcio ionizado $>$ a 58 mg/L) puede ser el resultado de una hipocalcemia materna prolongada debido a una multitud de causas. Consecuentemente resulta un grado variado de hiperparatiroidismo transitorio congénito. La hipercalcemia neonatal en el síndrome por deficiencia de fósforo se ha reportado en infantes pretérmino alimentados con leche materna.



Forma familiar. Hay una forma benigna de hipercalcemia familiar que es inherente a un rasgo resesivo. La hipercalcemia ligera (menos que 130 mg/L) ocurre y carece de efectos adversos aparentemente.

Hipocalcemia.

Las causas de hipocalcemia están actualmente clasificadas en relación con el mayor grado de interacción hormonal o bioquímico: vitamina D, HPT, calcitonina, calcio, magnesio y fosfato (ver cuadro a la derecha).

La deficiencia de vitamina D, la cual ha sido presentada antes, ocurre como el resultado de una reducción en la síntesis o la ingesta del compuesto padre de vitamina D, un metabolismo hepático alterado, y una disminución de la síntesis de calcitriol renal, el ultimo metabolito activo de la vitamina D.

El hipoparatiroidismo (primario y secundario) y el pseudohipoparatiroidismo se han discutido antes. La calcitonina o las infusiones de mitramicina disminuyen el transporte de calcio del hueso al espacio extracelular que resulta en hipocalcemia. La mala absorción intestinal de calcio puede tambien producir hipocalcemia. La pancreatitis aguda está asociada con los precipitados del complejo calcio-acidos grasos en el páncreas e hipocalcemia. La disminución de calcio ionizado en sangre ocurre con la infusión de agentes unidos al calcio (citrato y sangre tratada con citratos ácidos para transfusión, o EDTA), o alcalosis, los cuales cambian la fracción de calcio que es ionizada a la que está unida a la proteína. La hipomagnesemia resulta en hipocalcemia principalmente debido al efecto contrario de la hipomagnesemia en las glándulas paratiroides. Las condiciones en las cuales la concentración de fósforo está aumentada en la sangre, como en la insuficiencia renal, la infusión de fosfatos, o ls infantes recibiendo fórmulas de leche de vaca con un alto contenido de fosfatos, resultará en una disminución de las concentraciones de calcio ya que el calcio está desplazado del espacio extracelular al hueso y a los tejidos blandos y probablemente porque hay una respuesta abrupta del hueso al efecto de HPT.^{ref(769)}

La hipocalcemia neonatal se define como la concentración de calcio total de menos de 70 mg/L para los infantes a pretérmino o 80 mg/L para los infantes a término (con concentración de calcio ionizado menor a los 44 mg/L). La hipocalcemia neonatal es el resultado directo del relativo aumento del "punto de equilibrio" de HPT (ver pág. 535) establecida para el feto. Después del nacimiento, este valor para HPT disminuye, con la concomitante disminución de calcio en suero. En el nacimiento, la detención del alto flujo de calcio transplacentario al feto puede resultar en una hipocalcemia transitoria.

En el *prematureo* es la principal causa de hipocalcemia neonatal, la cual puede desarrollarse en una gran proporción de infantes prematuros (30% a 90%). La incidencia de hipocalcemia correlaciona inversamente con la edad gestacional y el peso al nacer. Su causa se desconoce. Cerca del 30% de los infantes con *asfixia al nacer* pueden desarrollar hipocalcemia durante el período neonatal.

El adenoma de la glándula paratiroidea es la causa más común de *hiperparatiroidismo materno* e hipercalcemia. La hipercalcemia materna suprime las glándulas paratiroides fetales, resultando en un hipoparatiroidismo congénito, o neonatal transitorio. Por lo menos, 50% de los recién nacidos de madres hiperparatiroides presentan hipocalcemia tetanica.

Las madres con *diabetes mellitus insulino-dependientes* tienen excesiva pérdida de magnesio urinario, especialmente si la euglucemia no se mantiene. Consecuentemente, estas

madres, y teóricamente sus fetos, pueden estar privados de magnesio. La *hipomagneemia* impide la secreción de HPT y puede explicar el hipoparatiroidismo neonatal transitorio y la hipocalcemia que puede desarrollarse en cerca del 50% de los infantes de madres diabéticas.

La hipocalcemia de los recién nacidos de madres con exposición gestacional a la terapia con *anticonvulsivantes* puede estar relacionada al efecto del fenobarbital o fenitoína en aumentar el metabolismo hepático acelerado de 25(OH)D (ver pág. 539). La hipocalcemia puede también describirse en algunos infantes nacidos de madres hipercalcémicas con hipercalcemia hipocalciúrica familiar.

Cambios en los compuestos analizados del eje hormona paratiroidea: vitamina D en hipercalcemia e hipocalcemia.

Los cambios en la concentración de fósforo en suero, de HPT, y de vitamina D, y del estado de vitamina D ayudan a evaluar las causas de la hipercacemia y la hipocalcemia. Si la HPT y la vitamina D están intactas, se observan dos efectos: (1) una producción activa del AMPc por los riñones; el AMPc renal está mejor determinado como AMPc "nefrogénico", el cual toma en consideración el AMPc no producido en el riñón, [ref\(770\)](#) y (2) la producción activa de 1,25- dihidroxicolecalciferol (calcitriol) (Tablas 28-3 y 28-4).

De las alteraciones *hipercalcemicas* listadas en la Tabla 28-3, las concentraciones de fósforo en suero están disminuidas en el hiperparatiroidismo debido a los efectos fosfatúricos de HPT; en el resto de las alteraciones hipercalcémicas, es evidente el escaso efecto sobre el fósforo sérico. En el hiperparatiroidismo, las concentraciones de HPT en suero y los compuestos analizados del eje HPT /vitamina D están aumentados. En la hipercalcemia por otras causas, la producción de HPT está suprimida. El eje HPT/vitamina D puede estar suprimido, excepto en la sarcoidosis, en la cual la elevación de la concentración de calcitriol en suero parece ser el problema principal.

El estado de la vitamina D se estima mejor midiendo las concentraciones en suero de 25-hidroxicolecalciferol (calcidiol). Aunque las concentraciones de 25-hidroxicolecalciferol están elevadas en la intoxicación por vitamina D, con o sin elevación de las concentraciones en suero de 1,25-dihidroxicolecalciferol (calcitriol).

En la *hipocalcemia* (Tabla 28-4) relacionada a las alteraciones paratiroideas, el hipoparatiroidismo o pseudohipoparatiroidismo, el fósforo sérico está elevado debido a la disminución de la excreción urinaria de fósforo. El eje HPT/vitamina D es generalmente hipofuncionante, excepto en el pseudohipoparatiroidismo, en el cual las concentraciones de HPT séricas estarán elevadas debido a la resistencia de los órganos diana a la hormona.

En las alteraciones de la vitamina D, las concentraciones de fósforo en suero están elevadas debido a la disminución de la excreción renal de fósforo. La unión HPT-AMPc en este caso puede estar aumentada debido al hiperparatiroidismo secundario a hipocalcemia; sin embargo, las concentraciones en suero de 1,25-dihidroxicolecalciferol permanecerán disminuidas debido a la deficiencia de vitamina D o al bloqueo en el metabolismo de la vitamina D. En el caso de un aumento de la resistencia a la 1,25-dihidroxicolecalciferol, se han encontrado concentraciones altas en suero de este metaolito, análogo a las concentraciones elevadas de HPT en el pseudohipoparatiroidismo. Las concentraciones de 25-hidroxicolecalciferol en suero estarán bajas en la deficiencia de vitamina D o cuando hay un bloqueo en la hidroxilación de 25-vitamina D, pero normal en las alteraciones de la vitamina D causadas por un bloqueo metabólico más allá de la hidroxilación hepática.



En las alteraciones minerales causadas por la hipocalcemia, poco efecto sobre la unión HPT/vitamina D se ha reportado. El hiperparatiroidismo secundario puede ser consecuencia de la hipocalcemia. En la hipomagnesemia, sin embargo, el hipoparatiroidismo puede ocurrir secundario a la deficiencia de magnesio.

Magnesio (ver pg 550)

Hipermagnesemia.

El exceso de magnesio es generalmente una consecuencia del aumento de la ingesta médica de magnesio. El magnesio (MgSO_4) se usa en el tratamiento de la hipertensión inducida por el embarazo (preeclampsia). La madre se hace hipermagnesémica (por arriba de 110 mg/L), así como su infante. Estudios clínicos recientes demuestran los aparentes beneficios del suplemento materno de magnesio en reducir la incidencia del nacimiento pretérmino y permitiendo así un crecimiento fetal mayor. La reducción en la excreción de magnesio puede ocurrir en la insuficiencia renal severa, y en el uso de los medicamentos que contienen magnesio (antiácidos, purgativos) que en este caso pueden resultar en hipermagnesemia^{ref(771)} (ver cuadro abajo).

Hipomagnesemia y deficiencia de magnesio.

En el humano, es poco común la deficiencia severa en magnesio, posiblemente porque el cuerpo desarrolla una gran capacidad para conservar el magnesio. Una disminución en la ingesta de magnesio causada por alteraciones gastrointestinales (estatorrea, malabsorción intestinal, resección intestinal) pueden causar deficiencia de magnesio. Una malabsorción intestinal específicamente de magnesio también ocurre y puede causar hipomagnesemia en la infancia. La malnutrición calórica-proteica está a menudo asociada con la privación de magnesio. La pérdida aumentada de magnesio urinario puede resultar de una enfermedad renal generalizada o de un defecto específico renal en la reabsorción de magnesio. La diálisis en los pacientes puede resultar en privación de magnesio si se usa una diálisis baja en contenido de magnesio. Una alta producción de aldosterona (hiperaldosteronismo), hiperparatiroidismo, y diabetes mellitus causan un aumento en la pérdida urinaria de magnesio. El alcoholismo, una terapia intensa en diuréticos y el tratamiento con el antibiótico gentamicina también resulta en un aumento en la pérdida de magnesio urinario^{ref(772)} (ver cuadro abajo).

La deficiencia de magnesio está a menudo asociada con hipocalcemia, y los síntomas y signos de la deficiencia de magnesio normalmente son los signos de la hipocalcemia. Aunque las concentraciones de magnesio en suero pueden estar bajas, pero debido a que el magnesio es predominantemente un mineral intracelular, la determinación de magnesio no refleja las concentraciones intracelulares. Las concentraciones de magnesio en las células rojas sanguíneas se han usado como una medida del estado de magnesio intracelular.

Fosfato (ver pág. 551)

Hiperfosfatemia.

La hiperfosfatemia es muy a menudo el resultado de la disminución de la excreción renal de los iones fosfatos, como ocurre en la insuficiencia renal aguda y crónica, particularmente cuando la relación de la filtración glomerular está reducida en menos del 25% de lo normal. La hiperfosfatemia también puede resultar de un aumento de la carga de fosfato

1130



corporal, la cual puede en turno resultar de los enemas y los laxantes conteniendo fosfatos, transfusiones de sangre, o hiperalimentación, o como el resultado de la destrucción masiva celular posterior a la lisis por terapia citotóxica (síndrome de lisis tumoral), o por lesiones de tejido (hipertermia, hipoxia, o lesiones por choque), las cuales resultan en randomiolisis y hemólisis. La reabsorción tubular renal de fosfatos es responsable de la hiperfosfatemia observada en el hipoparatiroidismo, hipertiroidismo, hipogonadismo, y exceso de hormona de crecimiento.

Hipofosfatemia.

La hipofosfatemia moderada, la cual se define como la concentración de fósforo en suero entre 10 y 25 mg/L en los adultos, es generalmente asintomática. En los niños, las concentraciones de fósforo en suero por abajo de 40 mg/L son a menudo consideradas anormales. La hipofosfatemia puede resultar de una disminución en la reabsorción intestinal de fosfato o por un aumento en la pérdida urinaria de fosfatos y un desplazamiento endógeno del fósforo inorgánico de los compartimientos de los fluidos extracelulares a los intracelulares.

Calcitonina

Las concentraciones de calcitonina sérica anormales se encuentran rara vez (**ver la parte de arriba del cuadro**). Las mediciones en suero son principalmente útiles en pacientes con sospecha de carcinoma medular de tiroides y con malignidad de las células C del tiroides. Este cáncer se observa frecuentemente en diferentes miembros dentro de la familia y a menudo está asociado con una tendencia a la malignidad (conocido como *el síndrome tipo II de neoplasia endócrina múltiple*).^{ref(773)} Las mediciones de calcitonina en suero son útiles tanto en el monitoreo de los miembros de la familia quienes están potencialmente en riesgo de desarrollar la enfermedad y en el seguimiento de los pacientes previamente tratados sospechosos de recaer en la enfermedad metastásica. Las elevaciones de la calcitonina en suero se producen en una variedad de neoplasias, la más frecuente es el carcinoma broncogénico.^{ref(774)} Debido a que la gastrina es un potente estímulo de la secreción de calcitonina, las concentraciones de calcitonina en suero esán elevadas en el síndrome Zollinger-Ellison, un tumor pancreático de las células secretoras de gastrina. Finalmente, la excreción de calcitonina está disminuida en pacientes con insuficiencia renal, y su disminución resulta en la elevación secundaria de las concentraciones en suero de calcitonina en estos pacientes.

Ya que la glándula tiroides es generalmente la fuente solamente de la producción de calcitonina, los pacientes sin tiroides carecen de calcitonina circulante. Los niveles de calcitonina están también disminuidos en algunos pacientes con osteoporosis. Esto puede causar que la regulación de la síntesis de calcitonina esté alterada o liberada.^{ref(775)}

Fosfatasa alcalina (ALP) (ver pág. 521)

En la practica clínica, la medición de la determinación de ALP mide un grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis de los esteres de fosfato en un medio alcalino.^{ref(776)} La fosfatasa alcalina se produce en varios tejidos (**ver la parte de abajo a la izquierda del cuadro**), pero solamente la porción producida en el hueso y el hígado se puede detectar en el suero de personas sanas. El cuadro de abajo lista las causas de las concentraciones de fosfatasa alcalina ósea anormales. Nótese que hay falta de sensibilidad y especificidad en las enfermedades óseas, particularmente en pacientes con osteoporosis, cuando la ALP en suero está generalmente dentro de los

rangos de referencia. La fosfatasa alcalina se produce en los osteoblastos y, como se discute antes, disminuye los niveles de pirofosfato óseo, el cual probablemente facilita la mineralización. La síntesis de fosfatasa alcalina es deficiente en la hipofosfatemia, una enfermedad rara hereditaria asociada con huesos desmineralizados y fracturas patológicas, y en la acondroplasia, una enfermedad inherente del hueso endocondral en crecimiento. La producción está también disminuida en la malnutrición generalizada.

Mucho más comunes que las concentraciones disminuidas son las enfermedades asociadas con concentraciones elevadas de fosfatasa alcalina ósea en suero. Estas elevaciones significan aumento de la actividad osteoblastica, como se observa en el sarcoma osteoblástico, el raquitismo, la enfermedad de Paget, y la acromegalia. Los niveles elevados asociados con el hiperparatiroidismo resultan de la mineralización ósea secundaria más que de una actividad osteoclástica inducida por HPT. Uno debe tener precaución al considerar la significancia patológica del aumento de fosfatasa alcalina en la niñez ya que el crecimiento es una causa fisiológica importante de dicha elevación.^{ref(777)} La elevación de fosfatasa alcalina hepática refleja una obstrucción biliar y no se presenta en gran extensión en la enfermedad hepatocelular pura (ver pág. 514).

Osteocalcina

Clínicamente, la concentración de osteocalcina en suero está elevada en las enfermedades óseas caracterizadas por un aumento de la actividad osteoblásticas incluyendo la enfermedad de Paget, la osteomalacia, la osteitis fibrosa y la osteodistrofia renal. Los niveles de osteocalcina sérica en estas enfermedades correlacionan con otros marcadores de la formación ósea, como son la fosfatasa alcalina y la histomorfometría ósea. La disminución sérica de HPT, de hormona tiroidea, o de hormona de crecimiento están asociadas con una disminución en la concentración de osteocalcina; el hiperparatiroidismo, la tirotoxicosis, y la acromegalia están asociadas con un aumento de la concentración de osteocalcina. La pubertad está asociada con un aumento en la concentración de osteocalcina, consistente con un aumento en la actividad osteoblástica que se acompaña con el crecimiento puberal acelerado y de las hormonas gonadales. Se ha reportado la variación circadiana de la concentración de osteocalcina en suero (los niveles altos son a las 4a.m. y nulos a las 5 p.m.), así como otros marcadores séricos de la formación y de la resorción ósea se desconocen, pero tanto la etiología como las implicaciones fisiológicas de estas observaciones se desconocen.^{ref(778)}

Hidroxiprolina (HP)

El colágeno, que está presente predominantemente en el hueso y en la piel, es la única fuente del aminoácido hidroxiprolina, la cual junto con la prolina, forman aproximadamente un tercio del total del contenido de aminoácidos del colágeno. La digestión del colágeno, asociada con el rompimiento del hueso o la piel, resulta en una elevada concentración de hidroxiprolina urinaria (UHP)(**ver cuadro abajo**).^{ref(779)} Sin embargo, la determinación de la concentración de UHP no es una prueba específica ya que las fuentes de hidroxiprolina incluyen el hueso, la dieta, los tejidos conectivos, las proteínas del suero, y la degradación de los propeptidos de la biosíntesis del colágeno. La UHP correlaciona pobremente con la resorción del hueso así como con la estimada por histomorfometría ósea y con los estudios de



cinética de calcio.[ref\(780\)](#)

Métodos de Análisis

Calcio

Steven C. Kazmierczak

Principios del análisis.

Los métodos para el análisis del calcio en fluidos biológicos se pueden dividir en técnicas de precipitación, quelación, o espectrofotometría de absorción atómica. Históricamente, los métodos para la determinación de la concentración de calcio total sérico (Ca) fueron los procedimientos de precipitación. Estos incluyen los métodos de Clark y Collip[ref\(781\)](#) (Tabla 28-5 método 1) y los procedimientos del cloranilato de calcio y naftil hidroxamato (Tabla 28-5 método 2). La cuantificación de calcio precipitado en el procedimiento de Clark y Collip es por titulación, mientras que las técnicas recientes son los ensayos colorimétricos.

Los métodos fluorescentes sensibles[ref\(782\)](#) para el análisis de calcio en suero o en orina tienen la ventaja de que requieren volúmenes pequeños de muestra (Tabla 28-5 método 3). El calcio y la calceína forman un complejo que a pH alto fluoresce a 520 nm (excitación a 490 nm). El complejo fluorescente se titula con *N'*-ácido tetracético (EGTA) etilen glicol p-bis(β -aminoetil eter)-*N*. Este compuesto se une al calcio del complejo lo que da como resultado una disminución de la fluorescencia. El volumen de EGTA requerido para titular el complejo es directamente proporcional a la concentración de calcio. No se ha reportado que el magnesio y el fósforo interfieran con este método.

El uso de compuestos específicos que unen al calcio proveen las bases de la mayoría de los métodos rutinarios de uso hoy en día. De estos compuestos de unión más comúnmente usada, es el de la cresolfataleína complexona. La cresolfataleína complexona forma un compuesto rojo a pH de 10 a 12 (Tabla 28-5 método 4). La interferencia con magnesio se elimina por la adición de la 8-hidroxiquinolina a la mezcla de reacción.[ref\(783\)](#) El cianuro de potasio también se puede adicionar a la mezcla de reacción para estabilizar al complejo rojo y para eliminar la interferencia por metales pesados. La diálisis de la muestra con solución ácida para liberar al calcio unido y reducir la interferencia por las proteínas del suero también se usa en algunos sistemas (Tabla 28-5 método 4b). El tinte de arsenazo III, es un indicador que cambia simultáneamente de color con los complejos con calcio, y es otro agente frecuentemente usado como agente que una al calcio. El citrato se ha reportado que causa una disminución significativa en las concentraciones de calcio en algunos sistemas que usan este indicador.[ref\(784\)](#)

Un método altamente sensible y específico para medir el calcio es la espectrofotometría de absorción atómica[refs\(785\)](#) (Tabla 28-5 método 5). Esta técnica mide la cantidad de luz que se absorbe por los átomos libres de calcio a una longitud de onda característica (422.7 nm). El calcio se disocia de la proteína y de los compuestos inorgánicos mediante una variedad de técnicas. El ácido se usa para disociar el calcio unido a la proteína, y el lantano y los iones de estroncio se agregan para disociar el calcio del fosfato, el oxalato, el citrato, el sulfato, y otros quelantes de calcio. Las interferencias por otros elementos tales



como el magnesio se reducen mediante el uso de una línea de absorción atómica específica para el calcio a 422.7 nm. Ver pág. 95 para más detalle sobre la técnica.

El método definitivo para la medición del calcio es la dilución isotópica por espectrofotometría de masas (Tabla 28-5 método 6). Este método, accesible solo en unos pocos laboratorios, es el estándar exacto contra el cual se deben comparar todos los métodos.

Espécimen.

El plasma heparinizado o el suero deben separarse prontamente para evitar que el calcio sea consumido por los eritrocitos.^{ref(786)} Los anticoagulantes que contienen calcio o que podrían quelar o precipitar al calcio, como son el EDTA, el oxalato, y el fluoruro, no se deben emplear.^{ref(787)} La muestra centrifugada debe almacenarse a temperatura ambiente hasta por 8 horas, a 4° C por un día, o en congelación hasta por un año.^{ref(788)} La venoestasis y la postura de pie pueden causar un aumento en el calcio de 4 a 6 mg/L.^{ref(789)}

La precipitación del calcio en la orina puede evitarse o puede redisolverse por la adición de 10 mL de 6 M HCl al recipiente de recolección. Mezclar con agitación.

Intervalos de referencia.

Población	Ca sérico mg/L (mmol/L)	Ca urinario mg/24 hr (mmol/24h)
Adultos		
Absorción atómica	89-105 (2.0-2.6)	Hombres, <275 (<6.87)
		Mujeres, <250 (<6.25)
Cresoftaleína complexona	80-105 (2.0-2.6)	Hipercalcémicos, >300(>7.50) Dieta promedio, 100- 250 (2.5-6.25)
Pediátricos		
(por absorción atómica solamente)		
Infantes prematuros	60-100 (1.5-2.5)	
Infantes a término	73-120 (1.8-3.0)	
1 a 2 años	100-120 (2.5-3.0)	

Magnesio

Steven C. Kazmierczak

Principio del análisis.

Una variedad de métodos se han reportado para la determinación de magnesio^{ref(790)}



incluyendo las técnicas de precipitación,[ref\(791\)](#) las técnicas complejométricas que usan EDTA,[ref\(792\)](#) los ensayos fluorométricos,[ref\(793\)](#) y la fotometría de llama.[ref\(794\)](#) Estos métodos raramente se usan hoy en día para medir las concentraciones de magnesio. La mayoría de los laboratorios clínicos utilizan los métodos colorimétricos, los que emplean más frecuentemente ya sea la calmagita o el azul de metileno como cromóforo. Éstos y otros métodos colorimétricos se comparan favorablemente con la espectrofotometría de absorción atómica, la cual es el método de referencia para el magnesio.[ref\(795\)](#)

El uso de calmagita [1-(1-hidroxi-4-metil-2-fenilazo)-2-naftol-4-ácido sulfónico] se introdujo para la determinación directa de magnesio sin desproteínación.[ref\(796\)](#) (Tabla 28-6, método 1). En este procedimiento, el magnesio reacciona con el reactivo de azul de calmagita coloreado formando un complejo rosa de magnesio-calmagita. El cambio de color del reactivo, de azul a violeta rojizo, es medido a 532 nm. La interferencia por el ion calcio se previene con el uso de EGTA, y de KCN (cianuro de potasio) que se usa para inhibir la reacción de los metales pesados con la calmagita. Otro método colorimétrico para la determinación de magnesio utiliza la reacción entre el magnesio y el azul de metiltimol. El complejo resultante se cuantifica bicromáticamente a 510 y 600 nm (Tabla 28-6, método 2). La especificidad del ensayo se aumenta mediante el uso de quelantes que previenen que el calcio interfiera en la reacción.

El uso de magán y de azul de xilidil son otros métodos colorimétricos frecuentemente usados para la determinación de magnesio.[ref\(797\)](#) El magnesio forma un complejo coloreado con el magon bajo condiciones alcalinas. La intensidad del color, medido a 520 nm, es proporcional a la concentración de magnesio de la muestra. El método de azul de xilidil se basa en la formación de un complejo rojo de magnesio y azul de xilidil. La absorbancia del complejo resultante a 500 nm es directamente proporcional a la concentración de magnesio.

El agente quelante clorofosfonazo III (CPZ) se usa para medir magnesio en suero y en orina (Tabla 28-6, método 3).[ref\(798\)](#) La reacción se inicia al introducir la muestra a un reactivo en tinte conteniendo CPZ y EGTA. El CPZ selecciona los complejos de magnesio presentes en la muestra mientras que el EGTA quela el calcio. Este primer paso da como resultado que disminuya la absorbancia a 550 nm y que aumente a 675 nm. En la segunda fase del ensayo, la reacción se titula al agregar EDTA, el cual remueve el magnesio y forma un complejo en tinte con el cambio de absorción resultante. Menos del 5% de interferencia se ha reportado en muestras que contienen más de 200 mg/L de calcio.[ref\(799\)](#)

La mayoría de las determinaciones de magnesio que se realizan en el laboratorio clínico miden la concentración del magnesio total que está presente. Sin embargo, el magnesio libre o ionizado, es la fracción fisiológicamente activa. Se ha progresado significativamente en el desarrollo de ionóforos para electrodos selectivos de iones para medir ya sea el magnesio intracelular o el extracelular (Tabla 28-6, método 4). Para fluidos extracelulares, como son la sangre, que tiene concentraciones de calcio más altas que de magnesio, el ionóforo no puede mostrar interferencia significativa al calcio. Para las determinaciones intracelulares de magnesio, las interferencias por calcio con el ionóforo son generalmente ignoradas, ya que la relación magnesio calcio dentro de la célula es aproximadamente 1000:1.[ref\(800\)](#)

Especimen.

Tanto el suero como los anticoagulantes para plasma con heparina son especímenes aceptados. Los anticoagulantes sanguíneos con citratos, oxalatos, o EDTA no son aceptables,

1135



ya que estos compuestos quelan al magnesio. Dado que los eritrocitos contienen magnesio en aproximadamente tres veces más la concentración de magnesio encontrada en el suero normal, las muestras con hemólisis no son aceptadas para el análisis de magnesio. El suero debe separarse de las células rojas tan pronto como sea posible después de la colecta de sangre.^{ref(801)}

Si la orina se va a analizar para la concentración de magnesio, la muestra debe ser acidificada a pH 1.0 con HCl concentrado para prevenir la precipitación de magnesio.

Intervalo de referencia.

Los cambios en las concentraciones de magnesio en suero se determinan a través de la ingesta en la dieta y en la excreción de magnesio. Los intervalos de referencia para magnesio en el suero de adultos es 1.5 a 1.9 mEq/L (18.0 a 23 mg/L).^{ref(802)}

Fósforo

Steven C. Kazmierczak

Principios del análisis y uso corriente.

El fósforo está presente en plasma en dos formas principales; en una forma orgánica principalmente asociada con lípidos y una forma inorgánica. Las formas inorgánicas pueden presentarse en suero como aniones monovalentes o divalentes. La relación entre las dos formas depende del pH en la sangre. Las concentraciones iguales de las formas monovalentes y divalentes están presentes en la acidosis, una relación 1:9 se observa en la alcalosis, y una relación 1:4 ocurre a pH 7.4. La relación monovalente y divalente de las formas de fósforo dependientes del pH dificulta el cálculo de la forma inorgánica de fosfato presente en un espécimen en particular. Así, el fósforo se reporta en unidades de miligramos o milimoles por volumen de espécimen y no en miliequivalentes ya que esto cambiaría con las variaciones en la relación de las formas monovalentes y divalentes.

El método más antiguo y todavía el más comúnmente usado para medir fósforo es el método del fosfomolibdato. Los iones de fosfato reaccionan con el molibdato de amonio para formar complejos de fosfomolibdato. Estos complejos se pueden cuantificar directamente midiendo su absorbancia a 340 nm, o al convertirlos a azul de molibdeno con agentes reductores, los cuales absorben a 660 nm (Tabla 28-7, método 1). Muchas variaciones del método se han descrito incluyendo los cambios del tipo de agente reductor usado, la temperatura a la cual se lleva a cabo la reacción, la concentración de molibdato, y la acidez de la reacción (Tabla 28-7, método 2 a 5). Las sustancias reductoras que se han usado incluyen la hidroquinina, el ácido sulfónico-4-1-amino-2-naftol (ANS), el cloruro estanoso, y el sulfato ferroso de amonio.^{refs(803)}

Ciertos compuestos, como los oxalatos, el citrato, el tartrato, el sorbitol, el manitol y la sílica pueden interferir con el método del molibdato al formar complejos con el molibdato.^{ref(804)} Además, las condiciones ácidas del procedimiento pueden causar hidrólisis de los compuestos de fosfato orgánicos.

Otro método común en la medición de fósforo involucra la medición de la absorbancia del complejo no reducido de molibdato de fósforo a 340 nm (Tabla 28-7, método 6).^{ref(805)} La falta del agente reactivo permite tiempos de reacción más prolongados y también mejora la estabilidad. Además, el cambio de absorbancia que ocurre es tres a cuatro veces más grande



en este método que en otros ensayos que usan agentes reductores.

Varios intentos enzimáticos para medir fósforo se han descrito (Tabla 28-7, método 7). Un método utiliza fosforilasa nucleica de purina y oxidasa de xantina para producir H_2O_2 a partir del fosfato y la inosina.^{ref(806)} Otro método enzimático emplea la fosforilación del glucógeno, usando fosforilasa A, acoplada con fosfoglutamato y glucosa 6-fosfato deshidrogenasa para medir el cambio de NADH a 340 nm.^{ref(807)} Este procedimiento tiene la ventaja de inhibir la interferencia por bilirrubina y su uso a pH neutro, los cuales minimizan la hidrólisis de los ésteres de fosfato.^{ref(808)}

Especímenes.

El suero o el plasma heparinizado es adecuado para el análisis. Los anticoagulantes como el citrato, el oxalato, y el EDTA no deben usarse porque inhiben la formación del complejo de fosfomolibdato. El suero y el plasma se deben separar pronto de las células rojas porque los eritrocitos contienen concentraciones de fósforo varias veces más altas que las encontradas en el suero. Una disminución momentánea en fósforo se observa después de la ingestión de alimentos o de la infusión intravenosa de glucosa. Esta disminución se atribuye al aumento en sangre del pH después de los alimentos, comúnmente referida como la "marea alcalina", la cual aumenta la formación in vivo de los complejos de calcio-fosfato, los cuales subsecuentemente aumentan su deposición en hueso. Otro mecanismo de la disminución de fósforo después de los alimentos es la captación insulino-dependiente de fósforo sérico por el músculo y las células del hígado, las cuales permiten la formación de intermediarios de glucosa-fosfato.

Intervalos de referencia.

En los hombres adultos y en las mujeres, de 25 a 48 mg de fósforo/L (0.81 a 1.55 mmol de fósforo/L).

LECTURAS SUGERIDAS

Referencias

Hueso estructura y función

1. Shipman P, Walker A, Bichell D, editors: *The human skeleton*, Cambridge, Mass., 1985, Harvard University Press.
2. Ham AW, Cormack DH: *Histology*, ed 8, Philadelphia, 1979, Lippincott.
3. Potts JT, Deftos LJ: Parathyroid hormone, calcitonin, vitamin D, bone and bone mineral metabolism. In Bondy PK, Rosenberg LE, editors: *Duncan's diseases of metabolism*, Philadelphia, 1974, Saunders.
4. Baylink DJ, Lin CC: The regulation of endosteal bone volume, *J Periodontol* 50:43-49, 1979.

Bioquímica y fisiología

5. DeLuca HF: The kidney as an endocrine organ for production of 1,25-dihydroxyvitamin D₃, a calcium-mobilizing hormone, *N Engl J Med* 289:359-365, 1973.



6. Hollick MF, Frommer JE, McNeill SC, et al: Photometabolism of 7-dehydrocholesterol to previtamin D3 in skin, *Biochem Biophys Res Commun* 176:107-114, 1977.
7. Avioli LV: Hormonal aspects of vitamin D metabolism and its clinical implications, *Clin Endocrinol Metab* 8:547-577, 1979.
8. Haddad JG, Stamp TCB: Circulating 25-hydroxyvitamin D in man, *Am J Med* 57:57-62, 1974.
9. Avioli LV, Haddad JG: Vitamin D: current concepts, *Metabolism* 22:507-531, 1973.
10. Chesney RW, Rosen JF, Hamstra AJ, DeLuca HF: Serum 1,25-dihydroxyvitamin D levels in normal children and in vitamin D disorders, *Am J Dis Child* 134:135-139, 1980.
11. Chesney RW, Rosen JF, Hamstra AJ, et al: Absence of seasonal variation in serum concentrations of 1,25-dihydroxyvitamin D despite a rise in 25-hydroxyvitamin D in summer, *J Clin Endocrinol Metab* 53:139-142, 1981.
12. DeLuca HF: The vitamin D system in the regulation of calcium and phosphorus metabolism, *Nutr Rev* 37:161-193, 1979.
13. Eisman JA, Pounce RL, Ward JD, Moseby JM: Modulation of plasma 1,25-dihydroxyvitamin D in man by stimulation and suppression tests, *Lancet* 2:931-933, 1979.
14. Gallagher JC, Riggs LB, Eisman J, et al: Intestinal calcium absorption and serum vitamin D metabolites in normal subjects and osteoporotic patients: effect of age and dietary calcium, *J Clin Invest* 64:729-736, 1979.
15. Kumar R, Cohen WR, Silva P, Epstein FH: Elevated 1,25-dihydroxyvitamin D levels in normal human pregnancy and lactation, *J Clin Invest* 63:342-344, 1979.
16. Austin LA, Heath H III: Calcitonin physiology and pathophysiology, *N Engl J Med* 304:269-278, 1981.
17. Huwiler R, Born W, Ohnhaus EE, Fischer JA: Plasma kinetics and urinary excretion of exogenous human and salmon calcitonin in man, *Am J Physiol* 236:15-19, 1979.
18. Ardaillou R: Kidney and calcitonin, *Nephron* 15:250-260, 1975.
19. Heersche JNM, Marcus R, Aurbach GD: Calcitonin and the formation of 3',5'-AMP in bone and kidney, *Endocrinology* 94:241-247, 1974.
20. Deftos LJ: Calcitonin. In Gray CH, James VHT, editors: *Hormones and blood*, New York, 1979, Academic Press.
21. Cooper CW: Recent advances with thyrocalcitonin, *Ann Clin Lab Sci* 6:119-129, 1976.
22. Alkawa JK: *Magnesium: its biologic significance*, CRC series on cations of biological significance, Boca Raton, Fla., 1981, CRC Press.
23. Tsang RC: Neonatal magnesium disturbances, *Am J Dis Child* 124:282, 1972.

Enfermedades óseas

24. Chase L: Osteopenia, *Am J Med* 69:915-922, 1980.
25. Parfitt AM, Oliver I, Villanueva AR: Bone histology in metabolic bone disease: the diagnostic value of bone biopsy, *Orthop Clin North Am* 10:329-345, 1979.
26. Ivey JL, Baylink DJ: Postmenopausal osteoporosis: proposed roles of defective coupling and estrogen deficiency, *Metab Bone Dis Rel Res* 3:3-7, 1981.
27. Avioli LV: Postmenopausal osteoporosis: prevention versus cure, *Fed Proc* 40:2418-2422, 1981.
28. Wallach S: Management of osteoporosis, *Hosp Pract* 13:91-98, 1978.
29. Gallagher JC, Riggs BL, Eisman J, et al: Intestinal calcium absorption and serum vitamin D metabolites in normal subjects and osteoporotic patients: effect of age and dietary calcium, *J Clin Invest* 64:729-736, 1979.
30. Slovik DM, Adams JS, Neer RM, et al: Deficient production of 1,25-dihydroxyvitamin D in elderly osteoporotic subjects, *N Engl J Med* 305:372-374, 1981.
31. Gallagher JC, Riggs BL, Jernbak CM, Arnaud CD: Effect of age on serum immunoreactive parathyroid hormone in normal and osteoporotic women, *J Lab Clin Med* 95:373-385, 1980.
32. Shamoni IM, Fumar AM, Tataryn IV, et al: Age-related changes of calcitonin secretion in females, *J* 1138



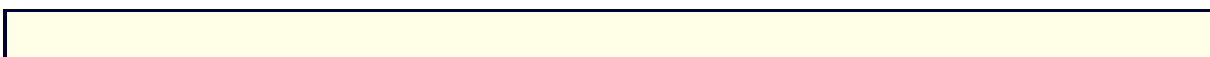
- Clin Endocrinol Metab* 50:437-439, 1980.
33. Gallaher JC, Riggs BL, DeLuca HF: Effect of estrogen on calcium absorption and serum vitamin D metabolites in postmenopausal osteoporosis, *J Clin Endocrinol Metab* 51:1359-1364, 1980.
 34. Avioli LV: Hormonal aspects of vitamin D metabolism and its clinical implications, *Clin Endocrinol Metab* 8:547-577, 1979.
 35. Winnacker JL, Yeager H, Saunders JA, et al: Rickets in children receiving anticonvulsant drugs, *Am J Dis Child* 31:286-290, 1977.
 36. Scriver CR, Reade TM, DeLuca HF, Hamstra AJ: Serum 1,25-dihydroxyvitamin D levels in normal subjects and in patients with hereditary rickets and bone disease, *N Engl J Med* 299:976-979, 1978.
 37. Brooks MH, Bell NH, Love L, et al: Vitamin D-dependent rickets type II: resistance of target organs to 1,25-dihydroxyvitamin D, *N Engl J Med* 298:996-999, 1978.
 38. Scriver C: Rickets and the pathogenesis of impaired tubular transport of phosphate and other solutes, *Am J Med* 57:43-49, 1974.
 39. Drezner MK, Lyles KW, Haussler MR, Harrelson JM: Evaluation of a role for 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in the pathogenesis and treatment of X-linked hypophosphatemic rickets and osteomalacia, *J Clin Invest* 66:1020-1032, 1980.
 40. Chesney RW, Rosen JF, Hamstra AJ, DeLuca HF: Serum 1,25-dihydroxyvitamin D levels in normal children and in vitamin D disorders, *Am J Dis Child* 134:135-139, 1980.
 41. Steichen JJ, Tsang RC, Greer FR, et al: Elevated serum 1,25-dihydroxyvitamin D concentrations in rickets of very low-birth-weight infants, *J Pediatr* 99:293-298, 1981.
 42. Chesney RW, Hamstra AJ, Mazess RB, et al: Circulating vitamin D metabolite concentrations in childhood renal diseases, *Kidney Int* 21:65-69, 1982.
 43. Massry SG, Ritz E: The pathogenesis of secondary hyperparathyroidism of renal failure: is there a controversy? *Arch Intern Med* 138:853-856, 1978.
 44. Singer FR, Schiller AL, Pyle EB, Krane SM: Paget's disease of bone. In Avioli LV, Krane SM, editors: *Metabolic bone disease*, vol 2, New York, 1978, Academic Press.
 45. Singer FR: Human calcitonin treatment of Paget's disease of bone, *Clin Orthop* 127:86-93, 1977.

Cambio del compuesto analizado en la enfermedad

46. Kooh SW, Jones G, Reilly BJ, Fraser D: Pathogenesis of rickets in chronic hepatobiliary disease in children, *J Pediatr* 94:870-874, 1979.
47. Drezner MK, Neelon FA, Jowsey J: Hypoparathyroidism: a possible cause of osteomalacia, *J Clin Endocrinol Metab* 45:114, 1977.
- 48a. Drezner MK, Neelon FA, Haussler, M: 1,25-Dihydroxycholecalciferol deficiency: the probable cause of hypocalcemia and metabolic bone disease in pseudohypoparathyroidism, *J Clin Endocrinol Metab* 42:621, 1976.
- 48b. Juttman JR, Buurman CJ, De Kam E, et al: Serum concentrations of vitamin D in patients with chronic renal failure: consequences for the treatment with 1- α -hydroxy derivatives, *Clin Endocrinol* 14:225-236, 1981.
49. Goldstein DA, Haldimann B, Sherman D, et al: Vitamin D metabolites and calcium metabolism in patients with nephrotic syndrome and normal renal function, *J Clin Endocrinol Metab* 52:116-121, 1981.
50. Chesney RW, Rosen JF, Hamstra AJ, DeLuca HF: Serum 1,25-dihydroxyvitamin D levels in normal children and in vitamin D disorders, *Am J Dis Child* 34:135-139, 1980.
51. Kumar R, Cohen WR, Silva P, Epstein FH: Elevated 1,25-dihydroxyvitamin D levels in normal pregnancy and lactation, *J Clin Invest* 63:342-344, 1979.
52. Tsang RC, Brown, DR: The parathyroids. In Kelley V, editor: *Practice of pediatrics*, vol 1, New York, 1979, Harper & Row.
53. Tsang RC, Venkataraman P: Pediatric parathyroid and vitamin D-related disorders. In Kaplan LA, editor: *Clinical pediatric and adolescent endocrinology*, Philadelphia, 1982, Saunders.



54. Taylor AB, Stern PH, Bell NH: Abnormal regulation of circulating 25-hydroxyvitamin D in the Williams syndrome, *N Engl J Med* 306:972-975, 1982.
55. Juan D: Hypocalcemia differential diagnosis and mechanisms, *Arch Intern Med* 139:1166-1171, 1979.
56. Broadus AE: Nephrogenous cyclic AMP, *Recent Prog Horm Res* 37:665, 1981.
57. Tsang RC: Neonatal magnesium disturbances, *Am J Dis Child* 124:282, 1972.
58. Aikawa JK: *Magnesium: its biologic significance*, CRC series on cations of biological significance, Boca Raton, Fla., 1981, CRC Press.
59. Grace K, Spiller IJ, Tashjian AH Jr: Natural history of familial medullary thyroid carcinoma: effect of a program for early diagnosis, *N Engl J Med* 229:980-985, 1978.
60. Silva OL, Brode LE, Doppman JL: Calcitonin as a marker for bronchogenic cancer, *Cancer* 44:680-684, 1979.
61. McTaggart H, Ivey JL, Sisom K, et al: Deficient calcitonin response to calcium stimulation in post-menopausal osteoporosis, *Lancet* 1:475-477, 1982.
62. Kaplan M: Alkaline phosphatase, *N Engl J Med* 286:200-201, 1972.
63. Root AW, Harrison HE: Recent advances in calcium metabolism, *J Pediatr* 88:1-18, 1976.
64. Nijadlik DC: Hydroxyproline, *Postgrad Med* 51:214-216, 1972.
65. Clark EP, Collip JB: A study of the Tisdall method for the determination of blood serum calcium with a suggested modification, *J Biol Chem Balt* 63:461-464, 1925.
66. Jackson JE, Breem M, Cheng C: Fluorometric titration of calcium, *J Lab Clin Med* 60:700-708, 1962.
67. Walmsley TA, Fowler RT: Optimum use of 8-hydroquinoline in plasma calcium determinations, *Clin Chem* 27:1782, 1981.
68. Beilby J, Randall A, Davis J: Variable citrate interference in arsenazo III dye assays of total calcium in serum, *Clin Chem* 36:824-825, 1990.
69. Kaplan LA, Pesce AJ: *Clinical chemistry: theory, analysis, and correlation*, St. Louis, 1984, Mosby, Chapt 3.
70. Cali JP, Bowers GN, Young DS, et al: A reference method for the determination of total calcium in serum. In Cooper GR, editor: *Selected methods of clinical chemistry*, vol 8, Washington, D.C., 1977, American Association for Clinical Chemistry.
71. Cadeau BJ, MacKay JS: *Serum calcium: review of methods*, ASCP Check Sample, vol 4, no 8, 1992, PTS 92-1 (PTS-59), American Society of Clinical Pathologists.
72. Lum G, Gambino SR: A comparison of serum versus heparinized plasma for routine chemistry tests, *Am J Clin Pathol* 61:108-113, 1974.
73. Winsten S: Collection and preservation of specimens, *Stand Methods Clin Chem* 5:1, 1965.
74. Caraway WT: Chemical and diagnostic specificity of laboratory tests, *Am J Clin Pathol* 37:445-464, 1962.
75. Elin RJ: Laboratory tests for the assessment of magnesium status in humans, *Magn Trace Elem* 10:172-181, 1992.
76. Denis W: The determination of magnesium in blood, plasma and serum, *J Biol Chem* 52:411-415, 1922.
77. Schwardenbach G, Bidermann W, Banserter F. Komplex-one VI: neue einfache Titriermethoden zur Bestimmung der Wasserharte, *Helv Chim Acta* 29:811-818, 1946.
78. Brien M, Marshall RT: An automated fluorometric method for the determination of magnesium in serum and urine using *o-o*-dihydroxyazobenzene: studies on normal and uremic subjects, *J Lab Clin Med* 68:701-712, 1966.
79. Gindler EM, Heth DA: Colorimetric determination with bound "calmagite" of magnesium in human blood serum, *Clin Chem* 17:663, 1971 (abstract).
80. Baginski ES, Marie SS: Magnesium in biological fluids, *Selected Methods Clin Chem* 9:277-281, 1982.
81. Dixon DJ, Denton J, Kaufman RA: New magnesium method for the CobasTM Chemistry Systems using chlorophosphonazo III, *Clin Chem* 36:1068, 1990.
82. Martin BJ, McGregor CW: Measurement of serum magnesium: effect of delay in separation from



- erythrocytes, *Clin Chem* 32:564, 1986.
83. Lowenstein FW, Stanton MF: Serum magnesium levels in the United States, 1971-1974, *J Am Coll Nutr* 5:399-414, 1987.
84. Bell RD, Doisey EA: Rapid colorimetric methods for the determination of phosphorus in urine and blood, *J Biol Chem* 44:55-67, 1920.
85. Fiske CH, Subbarow Y: The colorimetric determination of phosphorus, *J Biol Chem* 66:375-400, 1925.
86. Bartlett GR: Phosphorus assay in column chromatography, *J Biol Chem* 234:466-468, 1959.
87. Scott MG: *Inorganic phosphorus: review of methods*, *ASCP Check Sample* vol 8, no 5, 1992, PTS 92-5 (PTS-63), American Society of Clinical Pathologists.
88. Simonsen DG, Wertman M, Westover LM, Mehl JW: The determination of serum phosphate by the molybdivanadate method, *J Biol Chem* 166:747-755, 1946.
89. Adam A, Boulanger J, Azzouzi M, Ers P: Colorimetric versus enzymatic determination of serum phosphorus, *Clin Chem* 30:1724-1725, 1984 (letter).
90. Baginski ES, Epstein E, Zak B: Review of phosphate methodologies, *Ann Clin Lab Sci* 5:399-416, 1975.
91. Schultz DW, Passanneau JV, Lowry OH: An enzymatic method for the measurement of inorganic phosphate, *Anal Biochem* 19:300-314, 1967.

Tablas

Tabla 28-1. Anormalidades comunes en suero asociadas a enfermedad ósea metabólica.

Enfermedad	Ca	P	HPT	Alc PO ₄	Calcidiol	Calcitriol
Osteoporosis	N	N	N	N	N	B
Osteomalasia	B	B	A	A	N o B	N o B
Osteitis fibrosa	A o N	B o N	A	A	N	A o N

Alc PO₄, Fosfatasa alcalina; A, aumentado; B, disminuido; N, normal; HPT, hormona paratiroidea.

Tabla 28-2. Anormalidades bioquímicas asociadas al raquitismo.

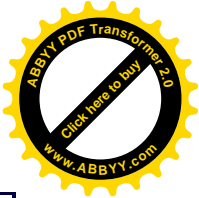
	Calcio sérico	Fósforo sérico	Hormona paratiroidea	Calcidiol	Calcitriol
Deficiencia en Vitamina D	B	B	A	B	B,N, o A
Dependencia de					



Vitamina D					
I	B	B	A	A	B
II	B	B	A	A	A
Resistencia a Vitamina D	N	B	N	N	N o B
Deficiencia de fósforo en la dieta	N	B	N	B	A
A, aumentado; B, disminuido; N, normal.					

Tabla 28-3. Compuestos analizados del eje hormona paratiroidea-Vitamina D en la hipercalcemia.

Enfermedad:	Hiperparatiroidismo
Fósforo sérico:	B
Hormona paratiroidea (HPT):	A
<u>Eje hormona paratiroidea vitamina D</u>	
AMP cíclico nefrogénico:	A
Calcitriol (1,25-dihidroxicolecalciferol):	A
<u>Estado de la vitamina D</u>	
Calcidiol (25-hidroxicolecalciferol):	N
Enfermedad:	Alteraciones de la vitamina D
Enfermedad:	Intoxicacion con vitamina D
Fósforo sérico:	N
Hormona paratiroidea (HPT):	B
<u>Eje hormona paratiroidea vitamina D</u>	
AMP cíclico nefrogénico:	B
Calcitriol (1,25-dihidroxicolecalciferol):	A o N
<u>Estado de la vitamina D</u>	
Calcidiol (25-hidroxicolecalciferol):	A
Enfermedad:	Calcitriol elevado en la sarcoidosis
Fósforo sérico:	N
Hormona paratiroidea (HPT):	B
<u>Eje hormona paratiroidea vitamina D</u>	
AMP cíclico nefrogénico:	B
Calcitriol (1,25-dihidroxicolecalciferol):	A
<u>Estado de la vitamina D</u>	
Calcidiol (25-hidroxicolecalciferol):	N
Enfermedad:	Sensibilidad a la vitamina D; idiopática hipercalcemia de la



	infancia
Fósforo sérico:	N
Hormona paratiroidea (HPT):	B
<u>Eje hormona paratiroidea vitamina D</u>	
AMP cíclico nefrogénico:	B
Calcitriol (1,25-dihidroxicolecalciferol):	N
<u>Estado de la vitamina D</u>	
Calcidiol (25-hidroxicolecalciferol):	N
Enfermedad:	Enfermedades no relacionadas con la hormona paratiroidea ni con la vitamina D
Enfermedad:	Malignidad
Fósforo sérico:	N
Hormona paratiroidea (HPT):	B
<u>Eje hormona paratiroidea vitamina D</u>	
AMP cíclico nefrogénico:	A o B
Calcitriol (1,25-dihidroxicolecalciferol):	B o A
<u>Estado de la vitamina D</u>	
Calcidiol (25-hidroxicolecalciferol):	N
Enfermedad:	Inmovilización
Fósforo sérico:	N
Hormona paratiroidea (HPT):	B
<u>Eje hormona paratiroidea vitamina D</u>	
AMP cíclico nefrogénico:	B
Calcitriol (1,25-dihidroxicolecalciferol):	B
<u>Estado de la vitamina D</u>	
Calcidiol (25-hidroxicolecalciferol):	N
Enfermedad:	Tirotoxicosis
Fósforo sérico:	N
Hormona paratiroidea (HPT):	B
<u>Eje hormona paratiroidea vitamina D</u>	
AMP cíclico nefrogénico:	N
Calcitriol (1,25-dihidroxicolecalciferol):	B
<u>Estado de la vitamina D</u>	
Calcidiol (25-hidroxicolecalciferol):	N
A, aumentado; B, disminuido; N, normal	

Tabla 28-4. Compuestos analizados del eje hormona paratiroidea-vitamina D en la hipocalcemia.

Enfermedad:	Alteraciones de las paratiroides:
Enfermedad:	Hipoparatiroidismo



Fósforo sérico:	A
Hormona paratiroidea (HPT):	B
<u>Eje hormona paratiroidea vitamina D</u>	
AMP cíclico nefrogénico:	B
Calcitriol (1,25-dihidroxicolecalciferol):	B
<u>Estado de la vitamina D</u>	
Calcidiol (25-hidroxicolecalciferol):	N

Enfermedad:	Pseudohipoparatiroidismo
Fósforo sérico:	A
Hormona paratiroidea (HPT):	A
<u>Eje hormona paratiroidea vitamina D</u>	
AMP cíclico nefrogénico:	B
Calcitriol (1,25-dihidroxicolecalciferol):	B
<u>Estado de la vitamina D</u>	
Calcidiol (25-hidroxicolecalciferol):	N

Enfermedad:	Alteraciones de la Vitamina D:
-------------	--------------------------------

Enfermedad:	Deficiencia de vitamina D
Fósforo sérico:	B
Hormona paratiroidea (HPT):	A
<u>Eje hormona paratiroidea vitamina D</u>	
AMP cíclico nefrogénico:	A
Calcitriol (1,25-dihidroxicolecalciferol):	A*, N o B
<u>Estado de la vitamina D</u>	
Calcidiol (25-hidroxicolecalciferol):	B

Enfermedad:	Enfermedad hepática y tratamiento con anticonvulsivantes
Fósforo sérico:	B
Hormona paratiroidea (HPT):	A
<u>Eje hormona paratiroidea vitamina D</u>	
AMP cíclico nefrogénico:	A
Calcitriol (1,25-dihidroxicolecalciferol):	N o B
<u>Estado de la vitamina D</u>	
Calcidiol (25-hidroxicolecalciferol):	B

Enfermedad:	Renal:
-------------	--------

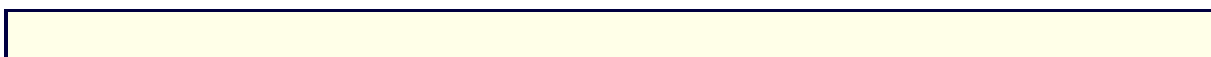
Enfermedad:	Raquitismo dependiente de Vitamina D
Fósforo sérico:	B
Hormona paratiroidea (HPT):	A
<u>Eje hormona paratiroidea vitamina D</u>	
AMP cíclico nefrogénico:	A
Calcitriol (1,25-dihidroxicolecalciferol):	B
<u>Estado de la vitamina D</u>	
Calcidiol (25-hidroxicolecalciferol):	N

Enfermedad:	Osteodistrofia
Fósforo sérico:	A
Hormona paratiroidea (HPT):	A
<u>Eje hormona paratiroidea vitamina D</u>	



AMP cíclico nefrogénico:	—
Calcitriol (1,25-dihidroxicolecalciferol):	B
<u>Estado de la vitamina D</u>	
Calcidiol (25-hidroxicolecalciferol):	N
Enfermedad:	Resistencia a 1,25-dihidroxicolecalciferol
Fósforo sérico:	B
Hormona paratiroidea (HPT):	A
<u>Eje hormona paratiroidea vitamina D</u>	
AMP cíclico nefrogénico:	A
Calcitriol (1,25-dihidroxicolecalciferol):	A
<u>Estado de la vitamina D</u>	
Calcidiol (25-hidroxicolecalciferol):	N
Enfermedad:	Alteraciones de los minerales:
Enfermedad:	Malabsorción de calcio
Fósforo sérico:	N
Hormona paratiroidea (HPT):	N o A
<u>Eje hormona paratiroidea vitamina D</u>	
AMP cíclico nefrogénico:	—
Calcitriol (1,25-dihidroxicolecalciferol):	—
<u>Estado de la vitamina D</u>	
Calcidiol (25-hidroxicolecalciferol):	—
Enfermedad:	Hipomagnesemia
Fósforo sérico:	N
Hormona paratiroidea (HPT):	B, N o A
<u>Eje hormona paratiroidea vitamina D</u>	
AMP cíclico nefrogénico:	—
Calcitriol (1,25-dihidroxicolecalciferol):	—
<u>Estado de la vitamina D</u>	
Calcidiol (25-hidroxicolecalciferol):	N
Enfermedad:	Carga alta en fosfatos
—	—
Fósforo sérico:	N
Hormona paratiroidea (HPT):	N o A
<u>Eje hormona paratiroidea vitamina D</u>	
AMP cíclico nefrogénico:	—
Calcitriol (1,25-dihidroxicolecalciferol):	—
<u>Estado de la vitamina D</u>	
Calcidiol (25-hidroxicolecalciferol):	—
A, aumentado; B, disminuido; N, normal.	
*Especialmente en la infancia	

Tabla 28-5. Métodos para determinar calcio.



Método	1. Precipitación por oxalato y titulación redox
Principio	$\text{Ca}^{++} + \text{Oxalato} \rightarrow \text{Oxalato de Ca (ppt)}$ $\text{Oxalato de Ca (ppt)} + \text{H}_2\text{SO}_4 \rightarrow \text{Oxalato} + \text{CaSO}_4$ $2\text{KMnO}_4 + 5 \text{Oxalato} + 3 \text{H}_2\text{O} @ 70^\circ\text{C} \longrightarrow \text{K}_2\text{SO}_4 + 2 \text{MnSO}_4 + 10\text{CO}_2 + 8\text{H}_2\text{O}$
Uso	Histórico
Comentarios	Método inicial de referencia
Método	2. Precipitación por aniones coloreados; espectrofotometría
Principio	$\text{Ca}^{++} + \text{Cloranilato} \longrightarrow \text{Cloranilato de Ca (ppt)}$ $\text{Cloranilato de Ca (ppt)} + \text{EDTA} + \text{OH}^- \longrightarrow \text{Ca-EDTA} + \text{Acido cloranílico (púrpura)}$
Uso	Histórico
Comentarios	Muy complicado, impreciso, hay muchos otros colorantes disponibles
Método	3. Titulación por complejos de Ca^{++}
Principio	$\text{Ca}^{++} + \text{Calceína} \longrightarrow \text{Ca-Calceína (fluorescente)}$ $\text{EGTA} + \text{Ca-Calceína} \longrightarrow \text{Ca}^+-\text{EGTA} + \text{Calceína (fluorescencia disminuida)}$
Uso	En pequeños laboratorios
Comentarios	Muestras de tamaño pequeño, instrumento delicado
Método	4. Complejos de calcio medidos por espectrofotometría
Principio a) Directo	$\text{Ca}^{++} + \text{Cresolfaleína} \longrightarrow \text{Complejo rojo (520 nm)}$
Uso	Es el más común
Comentarios	Se adaptó primero a una variedad de instrumentos automatizados; sesgo positivo comparado con absorción atómica
b) Indirecto	Complejo de $\text{Ca}^{++} + \text{H}^+$ Diálisis $\longrightarrow \text{Ca}^{++}$ en el recipiente El Ca^{++} es detectado como en método 4a



El Ca^{++} es detectado como en método 4a	
Uso	En el Autoanalizador Technicon
Comentarios	Igual que en el método 4a
Método	5. Absorción atómica
Principio	$\text{Ca}^{++} \xrightarrow{-2e^-} \text{Ca}^0$ $\text{Fotón} + \text{Ca}^0 \rightarrow \text{Ca}^*$
Uso	Método de referencia
Comentarios	Exactitud y sensibilidad excelentes
Método	6. Dilución isotópica
Principio	Ca^{++} y una cantidad conocida de un isótopo de calcio; aislar Ca^{++} y registrar la relación de dos isótopos en el espectrómetro de masas
Uso	Método definitivo
Comentarios	Disponible sólo en centros de referencia
Ca^* , átomo de calcio en estado excitado; Ca^0 , átomo de calcio en estado basal; <i>EGTA</i> , ácido etilenglicol -bis (-aminoetil-éter)- N, N' tetracético; <i>ppt</i> , precipitado.	

Tabla 28-6. Métodos para el análisis de magnesio

Método:	1. Calmagita
Principio:	$\text{Mg}^{3+} + \text{Calmagita} \rightarrow$ complejo rojizo-violeta (532 nm)
Uso:	El método más comúnmente usado.
Comentarios:	La adición de EGTA para prevenir la interferencia de Ca^{++}
Método:	2. Azul de Metiltimol
Principio:	$\text{Mg}^{++} + \text{Azul de Metiltimol} \rightarrow$ Complejo (510 y 600 nm).
Uso:	Frecuentemente usado
Comentarios:	Se adicionan quelantes para prevenir la interferencia de Ca^{++}
Método:	3. Clorofosfonazo III (CPZ)
Principio:	$\text{Mg}^{++} + \text{CPZ} \rightarrow$ Complejo $\text{Mg-CPZ} + \text{EDTA} \rightarrow \text{Mg-EDTA} + \text{CPZ}$ (550 nm)
Uso:	Frecuentemente usado
Comentarios:	Mínima interferencia por Ca^{++}



Método:	4. Electrodo selectivo de iones (para Mg ionizado solamente)
Principio:	Los ionóforos selectivamente se unen al magnesio, dando una señal potenciométrica
Uso:	Usado poco frecuentemente
Comentarios:	Disponible en algunos analizadores para sangre total.

Tabla 28-7. Métodos para la determinación de fosfatos.

Método:	1. Hidroquinona*
Principio:	Reducción de fosfomolibdato a azul de molibdeno.
Uso:	Histórico
Comentarios:	Irregular, rápido cambio de color
Método:	2. ANS (1-amino-2-naftol-4-ácido sulfónico)
Principio:	(Igual que el anterior)
Uso:	Histórico
Comentarios:	Mejor que el de hidroquinona
Método:	3. ANS + 100° C, 5 min
Principio:	(Igual que el anterior)
Uso:	Histórico
Comentarios:	Color intenso
Método:	4. SnCl ₂
Principio:	(Igual que el anterior)
Uso:	Flujo continuo pronto
Comentarios:	Se ha reemplazado por mejores métodos por la inestabilidad del reactivo, pobre linealidad y carencia de precisión.
Método:	5. SnCl ₂ + Hidrazina
Principio:	(Igual que el anterior)
Uso:	Flujo continuo
Comentarios:	Buena exactitud, limitada linealidad mejor estabilidad del reactivo que el método 4.
Método:	6. No reducción
Principio:	340 nm, monitoreo
Uso:	Discreto y continuo de flujo estabilidad.
Comentarios:	Buena exactitud, precisión y sensibilidad
Principio:	Bicromático
Uso:	Algunos analizadores discretos
Comentarios:	Bicromático (340 y 380 nm); problemas para ajustar el blanco con hemólisis y lipemia.
Método:	7. Enzimático PNP

Principio: $\text{HPO}_4^{++} + \text{Inosina} \longrightarrow \text{Hipoxantina} + \text{Ribosa-1-fosfato (XOD)} \longrightarrow \text{Hipoxantina} + 2\text{H}_2\text{O} + 2\text{O}_2$ (Acido urico + $2\text{H}_2\text{O}_2$ Peroxidasa
 $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{sustrato cromogeno} \longrightarrow \text{Complejo rojizo-púrpura}$ (Amáxima, 555 nm)

Uso: Analizadores discretos

Comentarios: No usados comunmente.

*Reacción: $\text{PO}_4 + \text{H}_2\text{SO}_4 + (\text{NH}_4)\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O} \rightarrow$ (complejo de Mo_7PO_4 + agente reductor \rightarrow (complejo azul heteropolimerico. *PNP*, Nucleosido fosforilasa de purina (E.C. 2.4.2.1); *XOD*, xantina oxidasa (E.C. 1.2.3.2); el sustrato cromogenico es *N*-etil-*N*-(metilfenil)-*N*-acetil etilendiamina.

Figuras

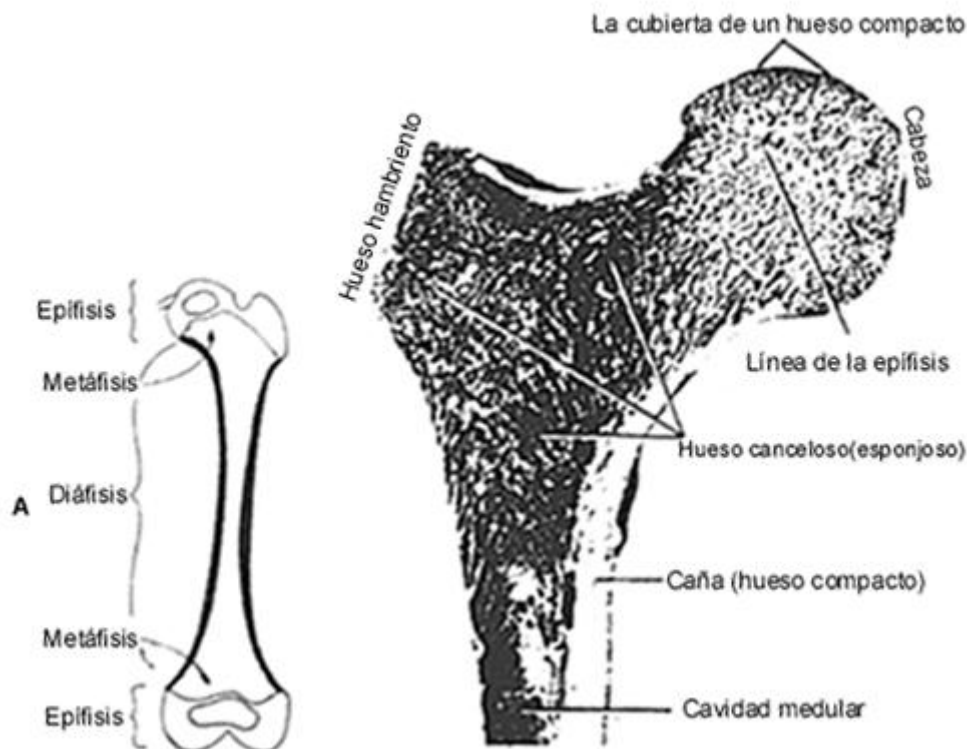


Figura 28-1 A, Partes de un hueso largo. B, Sección transversal de un hueso largo: note la predominancia de hueso esponjoso trabecular en la diáfisis (De: Copenhagen WM, Kelly DE, Wood RL, editors: *Bailey's textbook of histology*, ed 17, Baltimore, 1978,

Williams & Wilkins

Fisiopatología

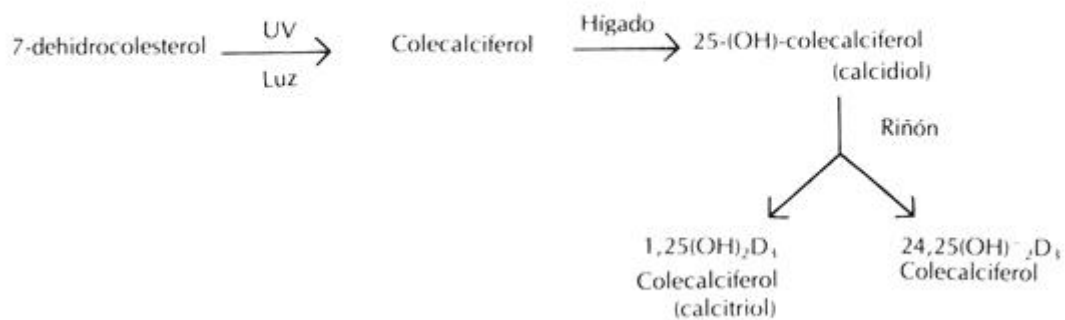


Figura 28-2 Conversión de 7-dehidrocolesterol a vitamina D activada con luz ultravioleta (UV) y por hígado y riñón.

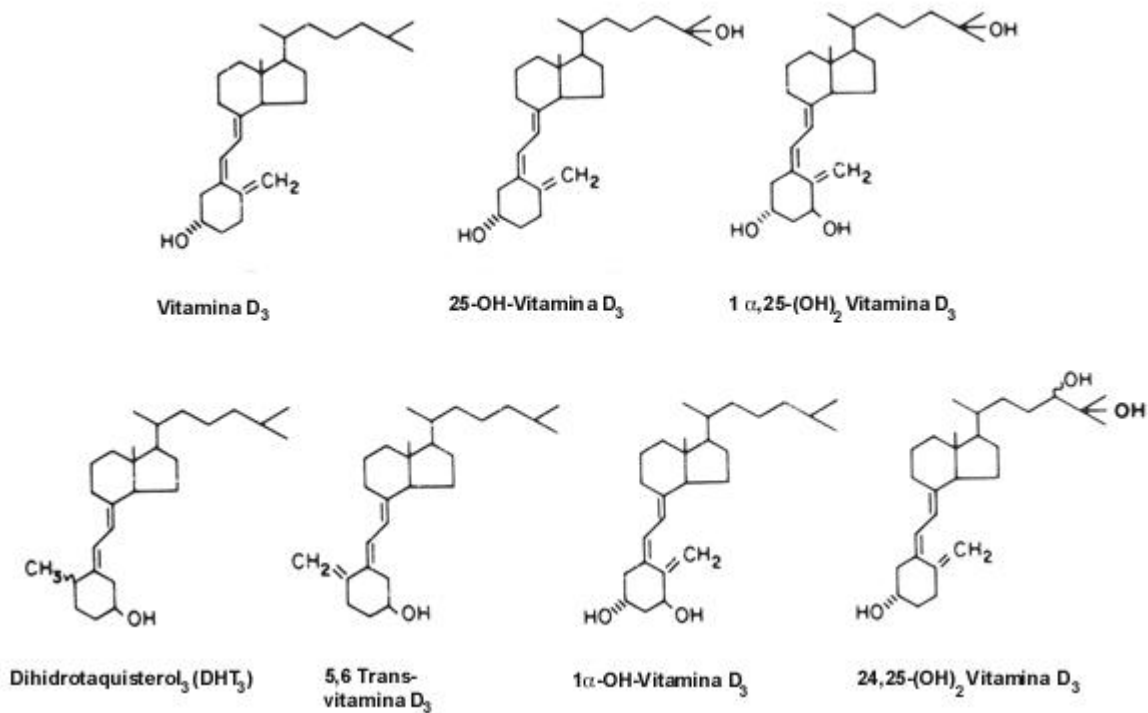


Figura 28-3 Algunos metabolitos comunes de colecalciferol

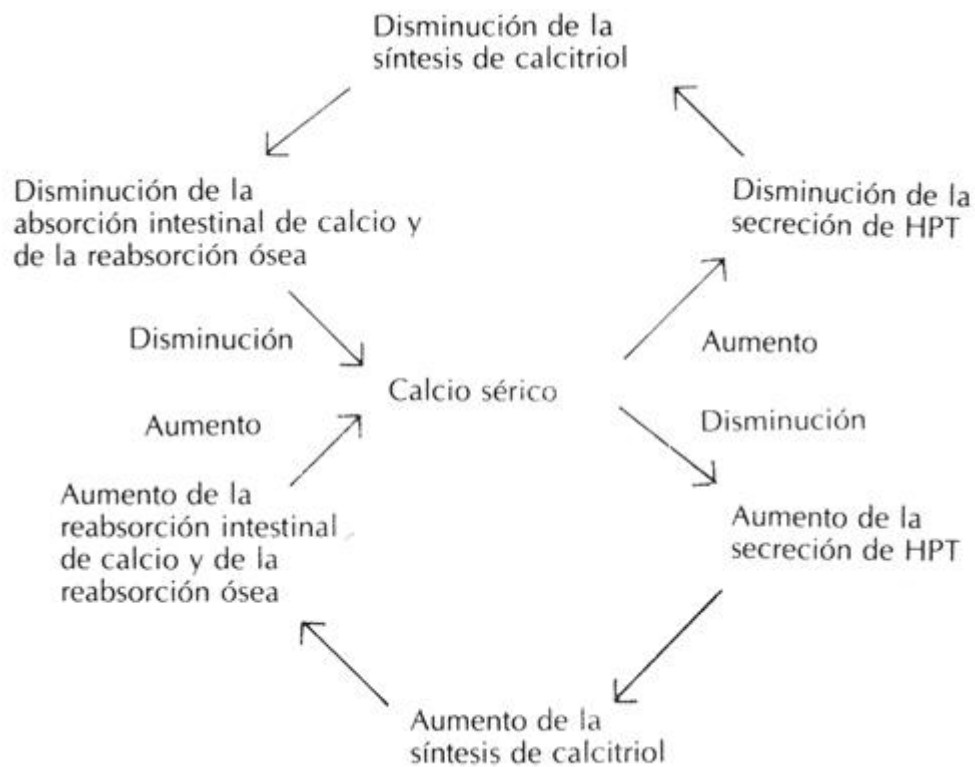


Figura 28-4 Interrelaciones de las concentraciones de calcio sérico con la hormona paratiroides, PTH, y calcitriol

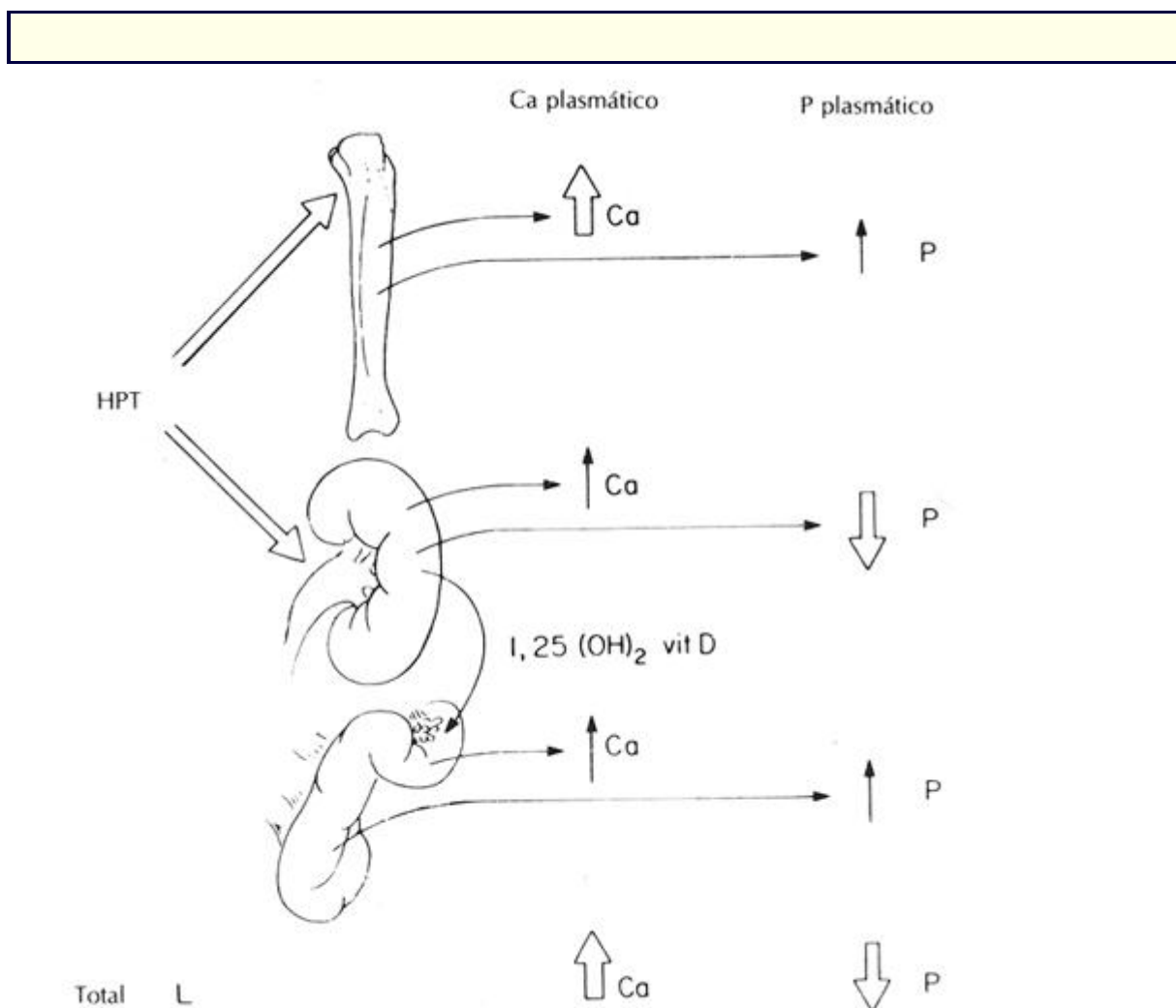
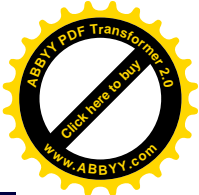


Figura 28-5 Fisiología de la hormona paratiroides normal. La acción de la hormona paratiroides incrementa las concentraciones de calcio sérico predominantemente a través de sus efectos en hueso y riñón, pero reduce las concentraciones de fósforo plasmático, P, mediante el incremento de la excreción de fósforo renal.(De Tsang RC, Noguchi A, Steichen JJ: *Pediatr Clin North Am* 26:223, 1979.)



Enfermedad ósea

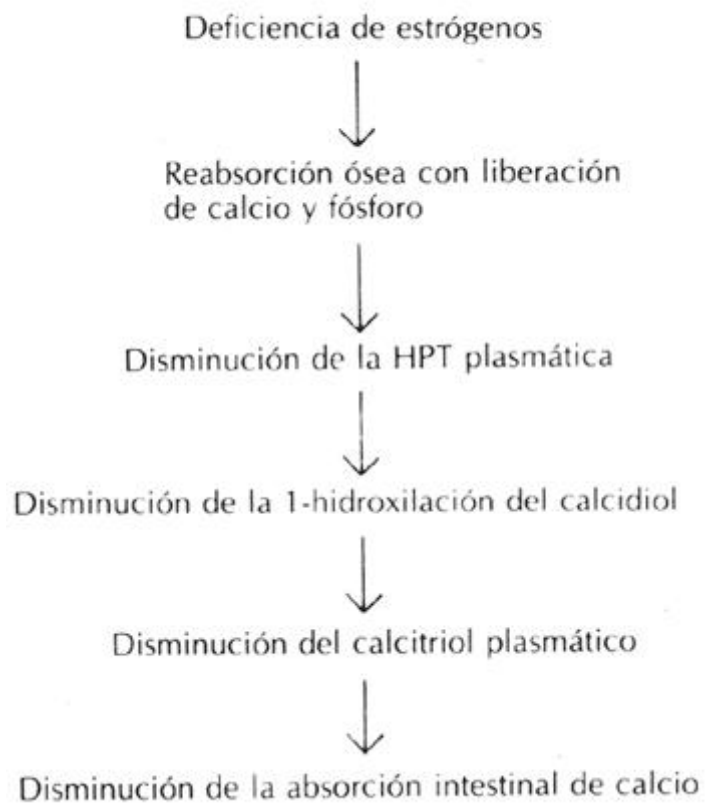


Figura 28-6 Modelo propuesto para la osteoporosis postmenopáusica

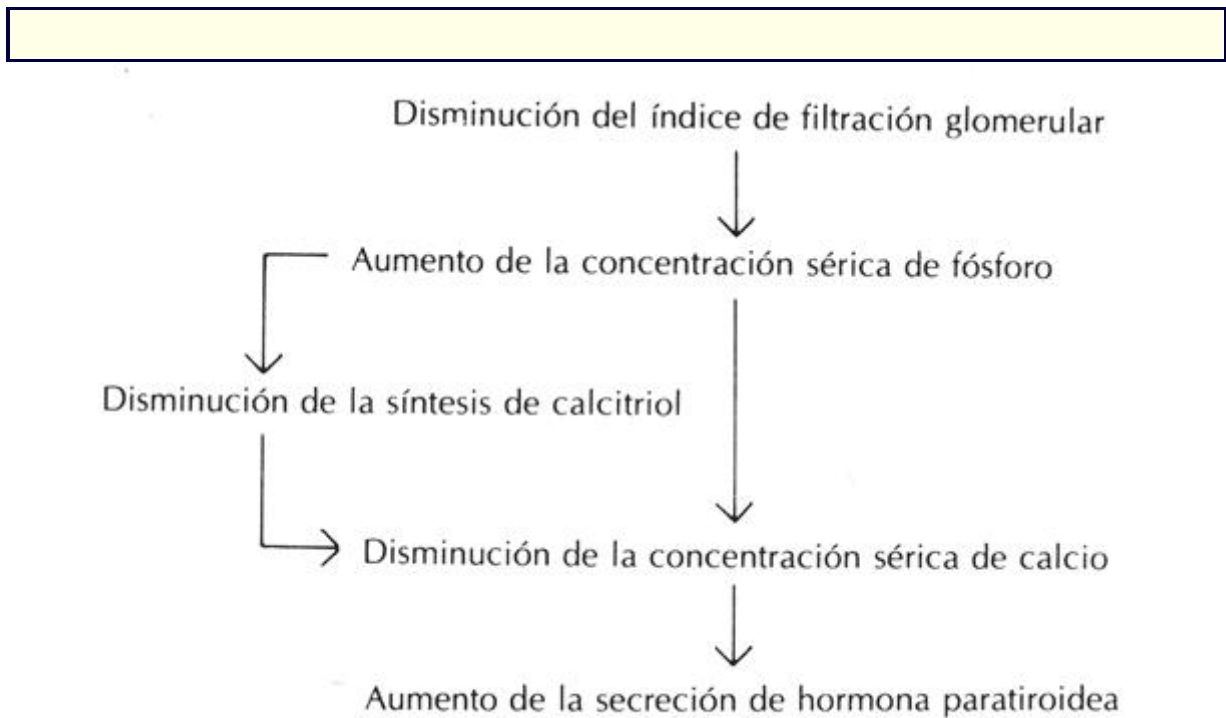


Figura 28-7 Mecanismo patológico de hiperparatiroidismo secundario en falla renal de acuerdo a la teoría del fosfato.

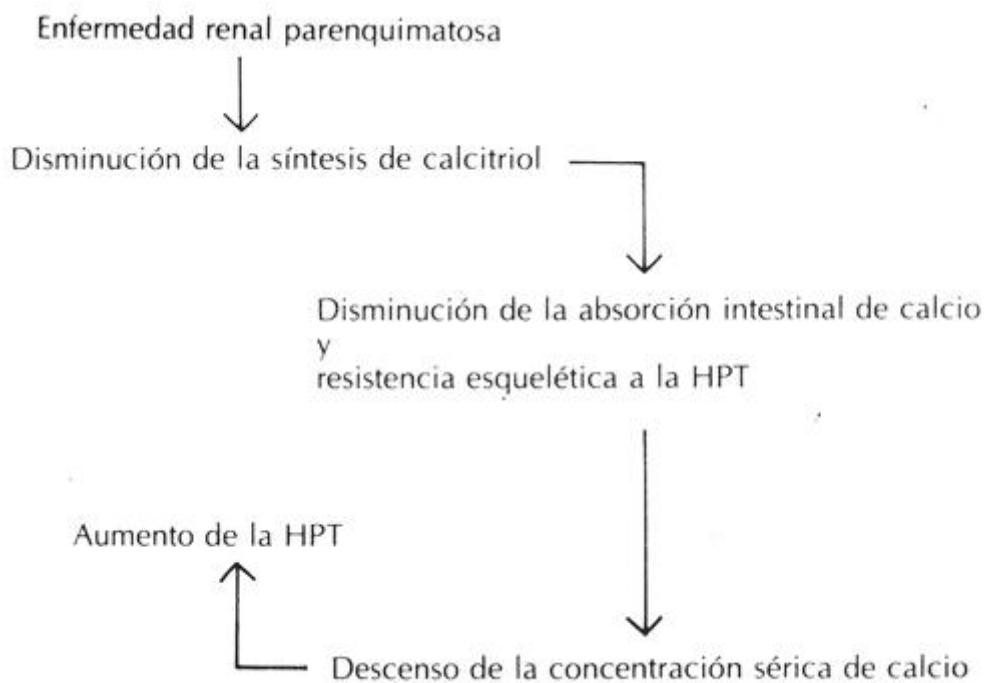


Figura 28-8 Mecanismo patológico de hiperparatiroidismo secundario en falla renal de acuerdo a la teoría de la vitamina D.

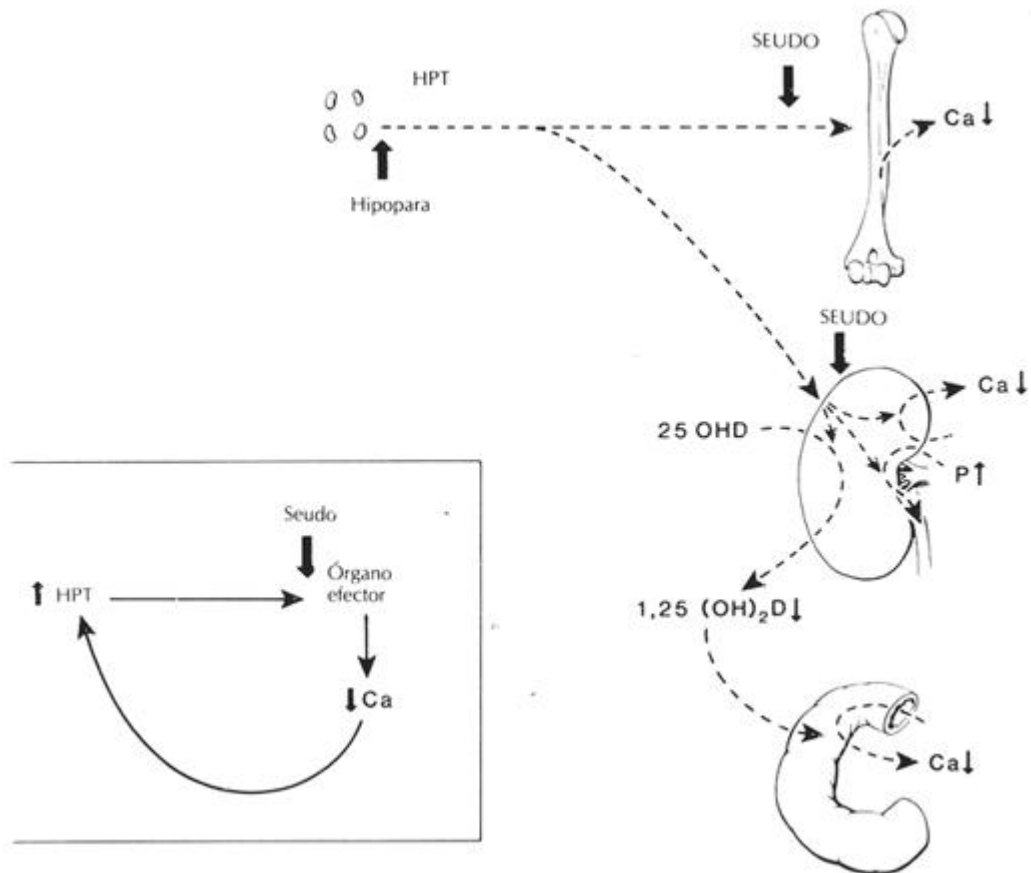


Figura 28-9 En el hipoparatiroidismo idiopático, la disminución de la hormona paratiroides causa una disminución en calcio sérico, aumento en fósforo sérico, y reducción en la producción de 1, 25-dihidroxi-vitamina D. En el pseudohipoparatiroidismo, aunque hay disponibilidad suficiente de la hormona, no hay respuesta de los órganos blanco y el resultado bioquímico es similar. *Recuadro*, En el hipopseudoparatiroidismo, las bajas concentraciones de calcio sérico resultantes sirven como un estímulo a la producción de la hormona paratiroides. Ya que las glándulas paratiroides están intactas, en contraste al hipoparatiroidismo idiopático, las concentraciones séricas de la hormona paratiroides se incrementarán en un intento de superar la resistencia del órgano blanco y rectificar la hipocalcemia.

CAPÍTULO 29



29. El Páncreas: Función y Patología Química

John A. Lott

Anatomía

Fisiología endocrina

Fisiología exocrina

Secreciones normales del páncreas exocrino

Secreciones normales del jugo pancreático

Control de las secreciones del páncreas exocrino

Condiciones patológicas

Enfermedades del páncreas endocrino

Enfermedades del páncreas exocrino

Pruebas de función pancreática

Daño inflamatorio o necrótico pancreático

Enfermedades destructivas

Neoplasias pancreáticas

Resumen

Métodos de análisis

Amilasa

Lipasa

OBJETIVOS

- ♦ Describir la anatomía del páncreas.
- ♦ Describir la fisiología endocrina y exocrina del páncreas; hacer énfasis en las funciones de los organelos endocrinos y de las secreciones exocrinas del órgano.
- ♦ Describir los factores que controlan las secreciones exocrinas del páncreas normal y cómo los alimentos y el alcohol estimulan la función pancreática en condiciones normales.
- ♦ Enlistar las principales enfermedades del páncreas exocrino y endocrino y cómo afectan los análisis de laboratorio que se realizan en los diversos líquidos corporales.
- ♦ Discutir la insuficiencia pancreática exocrina, sus causas, datos clínicos y cambios específicos que ocurren en las pruebas de laboratorio.
- ♦ Realizar un bosquejo de las causas posibles de pancreatitis aguda, datos clínicos, factores pronósticos y sus efectos en los exámenes de orina y sangre.
- ♦ Discutir acerca de la sensibilidad y especificidad de las determinaciones de enzimas pancreáticas comunmente usadas para el diagnóstico de pancreatitis, así como la utilidad de las curvas de características receptor operador, CRO (receiver-operating characteristic, en inglés) en la selección de los puntos óptimos de decisión de la prueba.
- ♦ Discutir sobre la Fibrosis Quística y las pruebas de laboratorio, especialmente las de función pancreática que son útiles en el diagnóstico de esta enfermedad.



- ♦ Discutir brevemente sobre el adenocarcinoma pancreático, su pronóstico y pruebas que se utilizan en la vigilancia de la progresión del cáncer.
- ♦ Hacer un resumen sobre el conocimiento actual sobre los tumores de los islotes y del papel del laboratorio en su diagnóstico.

Términos Clave

acinar La palabra acini proviene del latín *acinus*, que significa “mora” o “uva”. En anatomía, el término se refiere a una pequeña dilatación sacular.

adenocarcinoma Un crecimiento maligno que comienza en las células epiteliales; con respecto al páncreas, se refiere a las que cubren los conductillos y el conducto pancreático principal. Casi todos los cánceres del páncreas son adenocarcinomas.

ámpula de Vater Es una dilatación parecida a un frasco en donde se unen los conductos biliar y pancreático. El ámpula se une a la papila duodenal (una estructura que forma un pezón) y que su orificio está rodeado o circundado por un anillo de músculo liso llamado “esfínter de Oddi”. Observe que el ámpula y el esfínter son dos estructuras distintas.

caquexia Es un estado de debilidad progresiva, pérdida del apetito, desnutrición y pérdida de peso que se observa en algunas enfermedades crónicas así como en cáncer en estado avanzado.

colangiopancreatografía También conocida como una colangiopancreatografía endoscópica retrógrada (CPER). Se refiere a una técnica de diagnóstico invasiva en la cual el conducto pancreático es canulado y se le inyecta un medio de contraste para rayos X que permite visualizar los conductos biliares y pancreáticos.

colecistitis Inflamación de la vesícula biliar.

colecistocinina La colecistocinina (CCK) es una hormona gastrointestinal que es liberada cuando el duodeno se distiende después de ingerir alimentos o alcohol. Es un potente secretagogo pancreático, que produce una secreción abundante con alta concentración de bicarbonato pero baja en proteínas y enzimas. La CCK y la secretina, ambas, potencian sus acciones.

conducto pancreático Se refiere a un conducto que pasa a través del páncreas, colecta las secreciones del páncreas exocrino como enzimas, agua y electrolitos y los transporta al ámpula.

enterocinasa Es una enzima que se produce por la mucosa del intestino delgado y que convierte las proenzimas digestivas inactivas del páncreas a su forma activa.

gastrina Es una hormona que se produce en la mucosa del intestino delgado, que estimula en el estómago la secreción del HCl por las células parietales. La gastrina plasmática está muy aumentada en el síndrome de Zollinger-Ellison, una neoplasia frecuentemente pancreática, que en condiciones normales no está presente en el páncreas.

glicogenólisis Es un proceso bioquímico donde el glicógeno hepático y de músculo es convertido a glucosa.

glucagón Una hormona de los islotes que tiene múltiples actividades para elevar el nivel de glucosa en el plasma.

gluconeogénesis Es un proceso bioquímico donde la glucosa se sintetiza a partir de aminoácidos, lactato o glicerol.

gránulos de Zimógeno Es la forma de almacenamiento de las enzimas digestivas en las células acinares pancreáticas. Algunas de las enzimas, especialmente las proteolíticas y lipolíticas están presentes como zimógenos o precursores en su forma inactiva.

hipoglicemia Es una concentración baja de glucosa en la sangre, generalmente menor de 2.8 mmol/L (<500 mg/L), que provoca síntomas en algunos individuos.

insulina Es una hormona anabólica de las células de los islotes que controla la captación de glucosa, síntesis de grasa y de proteína.

islotes de Langerhans Son racimos de células pancreáticas que producen las secreciones endocrinas. Ellos constituyen cerca del 1% de la masa pancreática.

laparoscopia Es una técnica utilizada para ver al páncreas o a cualquier otro órgano abdominal. Se hace una pequeña incisión en el abdomen que permita insertar un instrumento para ver intrabdominalmente. Es quizás el método más objetivo y confiable para el diagnóstico de pancreatitis.

necrosis grasa peripancreática Es un fenómeno que ocurre en la pancreatitis aguda necrosante donde las enzimas lipolíticas del páncreas escapan de la glándula y provocan daño alrededor del páncreas.

neoplasias endocrinas múltiples También conocido como *MEN* (por sus siglas en inglés: *Multiple Endocrine Neoplasia*), el tipo MEN I de estas enfermedades a menudo involucra al páncreas y otros órganos endocrinos como las glándulas pituitaria, adrenales, tiroidea y paratiroidea. Es una enfermedad hereditaria con diferentes manifestaciones clínicas.

nervio vago El décimo par craneal que conduce fibras nerviosas motoras, sensoriales y autonómicas al cuello, tórax y abdomen, incluyendo el páncreas. La estimulación vagal del páncreas causa la liberación del jugo pancreático que es alto en enzimas pero bajo en volumen y electrolitos.

polipéptido pancreático Es una hormona de las células de los islotes (PP) que retarda la absorción de los alimentos, estimula las secreciones gástricas e intestinales e inhibe la motilidad intestinal.

polipéptido vasoinhibidor Es una hormona (PIV) que proviene de la mucosa intestinal y que tiene un efecto parecido al de la secretina sobre el páncreas.

proteólisis Es la capacidad para hidrolizar las proteínas a péptidos y aminoácidos.

secretina Es una hormona gastrointestinal que se libera cuando el duodeno se distiende después de la ingestión de alimentos o alcohol. Es un potente secretagogo que produce una secreción alta en proteínas y enzimas pero baja en volumen.

síndrome Zollinger- Ellison Es el cuadro clínico de un paciente con gastrinoma en el páncreas, duodeno o en ambos. Este tumor es con frecuencia maligno, secreta gastrina y estimula las células parietales del estómago para secretar HCl en cantidades no controladas.

somatostatina Es una hormona de las células insulares que tiene gran efecto inhibitorio sobre la secreción de insulina y glucagón, secreciones gástricas y secreción exocrina pancreática.

tripsina Es una potente enzima proteolítica producida en el páncreas pero almacenada en los gránulos de zimógeno en su forma inactiva como proenzima.

tripsina inmunoreactiva Es una forma de enzima digestiva que se encuentra en sangre. Por la presencia de una potente antiproteasa en sangre, la enzima tiene que medirse en suero como una proteína. Tiene poca o casi nula actividad enzimática en sangre.

tripsinógeno Es la forma enzimáticamente inactiva o zimógeno de la tripsina, también llamada *prototripsina*.

Anatomía

El páncreas tiene aproximadamente el tamaño y forma de la mano, la cola del páncreas apunta hacia el bazo y la cabeza se anida en el arco duodenal (Fig 29-1). Es una glándula muy suave y fácilmente traumatizable que se encuentra detrás del peritoneo, que se coloca atrás de la membrana serosa que recubre la pared abdominal. El páncreas recibe una abundante irrigación sanguínea proveniente de una arteria derivada de la aorta. La sangre de los islotes drena en la vena porta hepática, como la que proviene del tracto gastrointestinal. Las funciones exocrinas del páncreas se localizan en la célula acinar, centroacinar y ductal. Los acini exocrinos (Fig 29-2) drenan hacia conductillos que convergen en un conducto mayor (conducto pancreático) que se une al conducto biliar (colédoco) para formar el *ámpula de Vater*. Esta última drena a través de la papila duodenal, un orificio rodeado por el *esfínter de Oddi*, que permite a las secreciones pancreáticas exocrinas fluir hacia el tracto gastrointestinal.^{ref(809)} Excepto cuando el jugo pancreático se secreta, el esfínter está cerrado fuertemente para prevenir que el contenido gástrico y duodenal refluya hacia el páncreas. Las células acinares exocrinas y sus estructuras asociadas constituyen más del 98% de los 60 a 140 g de la masa pancreática.

Cerca del 1% (1 a 5 g) del páncreas consiste de acúmulos celulares únicos, los *islotes de Langerhans*, que producen las secreciones endocrinas. Un páncreas normal contiene de 1 a 2 millones de islotes (Fig 29-3).^{ref(810)} Las fibras nerviosas están presentes en el tejido pancreático productor de péptido vasoactivo intestinal (PIV), sustancia P, somatostatina, péptidos relacionados a encefalina y péptidos similares a bombesina (ver también en pág 577).^{ref(811)}

Fisiología Endocrina

La secreción pancreática endocrina proveniente de los islotes de Langerhans incluye las siguientes hormonas: glucagón de las células alfa, insulina de las células beta, somatostatina de las células delta, y polipéptido pancreático de las células F. La acción y control de estas hormonas se resumen en la Tabla 29-1.^{ref(812)} Alguna vez se consideró que la gastrina se encontraba en el páncreas normal, sin embargo, en la actualidad se acepta que la gastrina en

condiciones normales, sólo proviene de las glándulas de la mucosa intestinal.^{ref(813)}

Las células alfa, constituyen del 20 al 30% de las células de los islotes, producen *glucagón*, una hormona que actúa para aumentar las concentraciones de glucosa en sangre (ver capítulo 32); tiene una vida media de 5 a 10 minutos en sangre. La liberación de glucagón es estimulada por los factores que se muestran en la Tabla 29-1.

Las células beta producen *proinsulina*, la cual consiste de cadenas A y B, así como del péptido C (ver capítulo 32). La *insulina* es almacenada en los gránulos secretores, estas partículas migran hacia la pared celular y con estímulo apropiado, como es un nivel elevado de glucosa plasmática, son liberadas por exocitosis. La proinsulina es convertida normalmente a insulina, péptido C-terminal y otras proteínas antes de su liberación. La insulina tiene una vida media en sangre de 10 a 25 minutos. El péptido C no tiene una acción parecida a la insulina pero puede ser medido en sangre en pacientes que reciben insulina con el fin de valorar la función residual de las células beta.

Las células delta, constituyen cerca del 2 al 8 % de los islotes, producen la somatostatina, una hormona que inhibe la acción de insulina y de gastrina, inhibe la secreción exocrina de las enzimas pancreáticas, inhibe la liberación de la hormona del crecimiento y disminuye el flujo biliar. La somatostatina juega un papel en el metabolismo de la glucosa inhibiendo la secreción de la insulina; un aumento anormal de somatostatina puede llevar a diabetes mellitus (DM) por inhibición de la secreción de la insulina. Las células F producen el *polipéptido pancreático*, una hormona que estimula la secreción enzimática gástrica e intestinal y además inhibe la motilidad intestinal.^{ref(814)}

Fisiología Exocrina

Secreciones normales del páncreas exocrino

El páncreas produce por lo menos 22 enzimas digestivas, 15 de las cuales son proteasas, que actúan sobre tres principales fuentes de energía: proteínas, digeridas por las enzimas tripsina, quimotripsina y elastasa; lípidos, digeridos por las enzimas lipasa, fosfolipasa A₂ y carboxil esterasa; y carbohidratos complejos digeridos por α -amilasa.^{ref(815)} El ser humano sólo produce α -amilasa. Una enzima que hidroliza los enlaces α -1,4 glucolíticos del almidón y de otros complejos sacarogénicos. No podemos digerir la celulosa, un carbohidrato complejo que requiere la hidrólisis de la β -amilasa. Las unidades funcionales del páncreas exocrino están formadas por acúmulos de acini que almacenan las enzimas digestivas como *gránulos de zimógeno*; en condiciones normales no existen enzimas libres en el citoplasma de las células acinares (ver Fig 29-2). Los gránulos de estas células se liberan por exocitosis a los conductillos colectores para llegar finalmente al conducto pancreático. La mayoría de las enzimas están presentes en forma de zimógenos inactivos o en forma de *proenzimas*; excepto la ribonucleasa, desoxirribonucleasa, carboxilesterasa, amilasa, lipasa y colipasa.

La modificación que sufren las enzimas digestivas exocrinas de los gránulos de zimógeno en las células acinares a su forma activa, una vez que entran a la luz duodenal, se muestra en la Fig. 29-4. Las potentes enzimas proteolíticas como tripsina, quimotripsina, carboxipeptidasa A y B y elastasa constituyen más del 75% de las enzimas digestivas secretadas. Las formas de las enzimas proteolíticas que se encuentran como proenzimas contienen una pequeña cadena de aminoácidos que bloquea sus sitios protelíticos. Esta

providencia de la naturaleza previene la autodigestión de los gránulos de zimógeno, de las células acinares y desde luego del páncreas mismo; desafortunadamente esto se revierte en algunas enfermedades como en la pancreatitis. El páncreas también secreta inhibidores de proteasas con el fin de neutralizar alguna activación prematura de las enzimas.

A la entrada del duodeno, la *enterocinasa* (también llamada *enteropeptidasa*), una peptidasa proveniente de la mucosa duodenal, rompe cadenas pequeñas de aminoácidos de las proenzimas, por ejemplo convierte la protripsina a tripsina completamente activa. La tripsina libre activa a las otras proenzimas en cascada o como en una reacción en cadena y en menor grado a la misma protripsina (ver Fig. 29-4).

Jugo pancreático normal

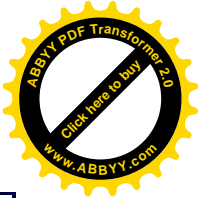
Un adulto con un peso de 75 kg produce aproximadamente de 2 a 3 litros por día de jugo pancreático acuoso, incoloro y cristalino que contiene las enzimas arriba descritas y 120 a 300 mmol/día de bicarbonato.^{ref(816)} La amilasa y lipasa, por ejemplo, están presentes en el jugo pancreático con enormes actividades digestivas de cerca de 500,000 a 1 millón de U/L.^{ref(817)} En condiciones normales, existe aproximadamente un gradiente de actividad enzimática de 10,000:1 entre el jugo pancreático y la sangre; de ahí que el mínimo paso del jugo pancreático en torrente sanguíneo puede producir aumentos considerables de amilasa, lipasa, tripsina y otras enzimas digestivas en suero. Los principales cationes en el jugo pancreático son Na^+ , K^+ , Ca^{++} y Mg^{++} , que totalizan una concentración cercana a los 150 $\mu\text{mol/L}$. Los principales aniones son el bicarbonato en concentraciones de cerca de 120 $\mu\text{mol/L}$, comparado con alrededor de 25 $\mu\text{mol/L}$ en plasma y Cl^- en cerca de 30 $\mu\text{mol/L}$, comparado con una concentración plasmática de alrededor de 100 $\mu\text{mol/L}$.

El agua y los electrolitos del jugo pancreático son secretados por las células ductales y centroacinares. El páncreas sano puede secretar bicarbonato hacia el jugo pancreático e hidrógeno hacia el torrente sanguíneo. Normalmente hay más que suficiente bicarbonato pancreático para neutralizar el ácido proveniente del estómago.

Control de la secreciones pancreáticas exocrinas.

Las secreciones exocrinas del páncreas tienen control tanto neural como hormonal que se resume en la Tabla 29-2.^{ref(818)} Tres hormonas de la mucosa del tracto gastrointestinal superior, colecistocinina (CCK), secretina y gastrina, intervienen en la secreción del jugo pancreático.^{ref(819)} La distensión del duodeno por comida o por alcohol lleva a la liberación de las tres hormonas. En particular, las grasas y el alcohol son estimulantes activos de la secreción.^{ref(820)} Existe un mecanismo de retroalimentación: la tripsina liberada como consecuencia de la liberación de CCK tiene una acción inhibitoria sobre la secreción subsecuente.^{ref(821)} La PIV es estructuralmente similar a la secretina y al glucagón; esto probablemente explique la acción similar del PIV sobre el páncreas. Todas las secreciones pancreáticas exocrinas, así como otras funciones gastrointestinales son inhibidas por la somatostatina.

Condiciones Patológicas



Las enfermedades del páncreas pueden ser agrupadas en general en ciertas áreas: alteraciones endocrinas como la diabetes mellitus y trastornos en la secreción de glucagón; exocrinas como la insuficiencia pancreática y absorción intestinal deficiente asociada; inflamatorias como la pancreatitis aguda; destructivas como aquellas que resultan de la fibrosis quística y de la pancreatitis crónica; infecciosas de muchos tipos, incluyendo al virus de la inmunodeficiencia humana (VIH); ateroscleróticas y atróficas; y neoplásicas como adenocarcinomas y tumores de la células de los islotes. El énfasis aquí se dará sobre las enfermedades en las que haya cambios químicos en los líquidos corporales o respuestas químicas anormales a ciertos estímulos. Las pruebas de laboratorio son uno de los instrumentos usados para definir enfermedades pancreáticas. La obtención de una historia clínica cuidadosa con exploración física y estudios de imagen como la colangiopancreatografía endoscópica retrógrada (CPRE), ultrasonografía, tomografía computarizada, resonancia magnética y radiología convencional son de gran importancia cuando se usan adecuadamente para diagnóstico.^{ref(822)} La estimación del tamaño del páncreas por métodos de imagen es importante. Una glándula inflamada o edematosa es generalmente mayor que lo normal y constituye un hallazgo diagnóstico de importancia. Incluso puede ser útil la observación directa y palpación por *laparotomía* o laparoscopia; de hecho, se considera el estándar para diagnosticar enfermedades como pancreatitis.

Enfermedades pancreáticas endocrinas.

El mayor trastorno endocrino es la diabetes mellitus (DM), una enfermedad con morbilidad y mortalidad mucho mayor que todas las otras alteraciones pancreáticas combinadas.^{ref(823)} La insulina es necesaria para la vida y una deficiencia relativa o absoluta de ella lleva a la DM. La diabetes y las pruebas usadas en su diagnóstico y seguimiento son discutidas en forma más completa en el capítulo 32. Una amilasa sérica anormal en ausencia de pancreatitis es común en DM incontrolada, especialmente en presencia de cetoacidosis diabética. La liberación de amilasa puede ser la consecuencia de la acidemia en estos casos. El trasplante combinado de páncreas y riñón se usa en la actualidad con excelentes resultados para pacientes con DM y enfermedad renal terminal.^{refs(824)} (ver capítulo 50) La restauración de la función renal y pancreática endocrina ocurre en la mayoría de los pacientes receptores de trasplantes de riñón y páncreas.

Enfermedades pancreáticas exocrinas.

La reducción o pérdida de la función pancreática exocrina (digestiva) lleva a trastornos gastrointestinales graves como diarrea, constipación y absorción deficiente. En los casos de enfermedad avanzada aparece un estado catabólico que lleva a pérdida de peso y caquexia. El páncreas exocrino tiene amplias reservas; los síntomas generalmente aparecen cuando cerca del 85 % a 90 % del tejido acinar se pierde. Las causas más importantes de pérdida de las células acinares se enlistan en el cuadro de la pág. 561.

Causas de Pérdida de las Células Acinares
· Ataques repetidos de pancreatitis, especialmente los causados

- por alcoholismo crónico.
- Fibrosis quística (FQ).
 - Aterosclerosis y atrofia pancreática subsecuente.
 - Cualquier obstrucción del conducto o conductillos pancreáticos como los causados por uno o más cálculos o calcificaciones de la glándula, un tumor benigno o maligno que comprima el páncreas u otros tipos de bloqueo mecánico

Pruebas de función pancreática

Pruebas para volúmenes o compuestos analizados en el jugo pancreático.

Las pruebas de función pancreática representan un intento de exploración de la capacidad del páncreas para producir enzimas, proteínas y bicarbonato y para secretar un adecuado volumen de líquido hacia el duodeno. Las pruebas de función pancreática actuales pueden ser clasificadas en cuatro grupos (Tabla 29-3). Hay pruebas que miden el volumen líquido y el flujo de bicarbonato o la actividad residual enzimática en el jugo pancreático. Los exámenes fecales miden grasa no digerida, alimentos o enzimas; los exámenes en jugo duodenal, sangre u orina determinan sustancias endógenas o exógenamente administradas; y las pruebas de aliento determinan $^{13}\text{CO}_2$ o $^{14}\text{CO}_2$ producido por la acción de las enzimas pancreáticas sobre componentes marcados, habitualmente grasas o ésteres.

Después de la intubación con una sonda de dos vías a través del esófago y estómago hasta un punto en el duodeno debajo del ampolla, el paciente se estimula con CCC intravenosa, secretina o ambas. El contenido duodenal se colecta para la determinación de bicarbonato, volumen del líquido y enzimas como amilasa, lipasa, tripsina o quimioterapia. La producción de bicarbonato y agua son pruebas razonablemente sensibles de función pancreática, mientras que el flujo enzimático es menos sensible. Pacientes con pérdidas significativas de la función pancreática pueden tener volumen y bicarbonato normales porque hay una gran reserva de la capacidad funcional del páncreas. Las determinaciones enzimáticas en el jugo pancreático pueden ser completamente normales en pacientes con pérdida moderada del tejido acinar; las alteraciones aparecen cuando el páncreas está casi exhausto de su capacidad sintética de enzimas. Por lo tanto, el análisis de las enzimas pancreáticas obtenidas por sondeo duodenal o pancreático tiene valor limitado en pacientes con insuficiencia pancreática leve o moderada. En aquellos casos con daño exocrino extenso como en pacientes con episodios repetidos de pancreatitis o niños con fibrosis quística, el análisis del jugo duodenal tiene una buena sensibilidad.

Pruebas en heces.

La grasa fecal anormal en muestras de 72 horas permanece como el estándar para el diagnóstico de insuficiencia pancreática. El paciente *debe* consumir 80 a 100 g de grasa por día por al menos una semana antes de la colección de la muestra. La grasa no digerida en heces se mide por exámenes cuantitativos y cualitativos. La prueba puede prestarse a confusión en enfermedades intestinales que alteran la absorción de grasa, además de que la esteatorrea anormal aparece cuando 85% a 90% del tejido acinar pancreático se pierde.^{ref(825)} Las pruebas para tripsina y quimiotripsina fecal no son confiables.^{ref(826)} (ver capítulo 30 para



mayor información).

Pruebas en suero, orina y aliento.

La determinación de amilasa, lipasa y fosfolipasa A₂ en suero carece de sensibilidad y es esencialmente inútil para investigar la función. La tripsina inmunorreactiva (TIR) consiste al menos de dos proteínas únicas, una forma aniónica y otra catiónica que difieren en su punto isoeléctrico (pH) y movilidad electroforética a pH 8.6. La determinación en suero de tripsina catiónica, tripsina aniónica o quimotripsina como proteínas son las mejores pruebas y la TIR en muestras de sangre seca se ha recomendado como prueba de escrutinio para fibrosis quística en recién nacidos.^{ref(827)} La prueba del NBT-PABA (Bentiromida) se usa en varios centros para evaluar la función pancreática digestiva. La sustancia usada es el ácido *p*-aminobenzoico unido a una cadena corta de aminoácidos sintéticos. En individuos sanos, las enzimas porteolíticas del jugo pancreático dividen a la molécula y el PABA es absorbido en el intestino delgado y después excretado en la orina donde se mide. Desafortunadamente la prueba tiene pobre especificidad y se altera no sólo por la secreción de enzimas pancreáticas sino también por la absorción intestinal, la función hepática (conjugación) y la excreción renal. El PABA puede ser medido en el suero, lo que elimina la fase renal en pacientes con enfermedades del riñón.

Las grasas marcadas con ¹³¹I, ¹³C ó ¹⁴C se han propuesto como pruebas de función pancreática. Si las enzimas pancreáticas hidrolizan la grasa o los ésteres de colesterol, el ¹³¹I puede ser medido en orina con un contador gamma o alternativamente, ¹³CO₂ ó ¹⁴CO₂ ser medido en el aire espirado con espectrofotómetro de masas o un contador beta, respectivamente.^{ref(828)} Una estrategia similar emplea el éster de fluoresceína del ácido láurico. La lipasa pancreática separa al éster y la fluoresceína es medida en orina o sangre. Casi todas las pruebas de función del páncreas, ya sea empleando compuestos analizados endógenos (como TIR) o exógenos (como NBT-PABA), tienen sensibilidad limitada.

Daño pancreático inflamatorio o necrótico **Pancreatitis aguda.**

La pancreatitis aguda puede ser una emergencia que atenta contra la vida de los pacientes y debe distinguirse de otras enfermedades con presentación similar. En el cuadro de abajo se enlistan varios de los diagnósticos diferenciales de pacientes con dolor abdominal y generalmente enzimas pancreáticas anormales.

Problemas Clínicos Asociados con Dolor Abdominal y Elevación de Enzimas Pancreáticas	
<ul style="list-style-type: none">••••••••	Pancreatitis, úlcera gástrica perforada
	Infarto de la arteria mesentérica
	Trastornos del tracto biliar
	Colecistitis
	Vesícula gangrenosa
	Inflamación u obstrucción en cualquier parte del tracto gastrointestinal o cavidad abdominal
	Abscesos en cualquier parte del abdomen



- Peritonitis
- Insuficiencia renal
- Volvulus
- Aneurisma disecante de la aorta
- Cetoacidosis diabética
- Enfermedades del tejido conectivo con vasculitis
- Embarazo ectópico
- Inflamación de las trompas de falopio [refs\(829\)](#)

El dolor intenso, transfixivo, asociado con náusea y vómito son los hallazgos más comunes con los que se presenta la pancreatitis aguda. La enfermedad varía de una forma leve, autolimitada, la pancreatitis edematosa, hasta una completa explosión necrosante, la pancreatitis hemorrágica que con frecuencia tiene un desenlace fatal. Cualquier factor que obstruya el aporte sanguíneo aferente (llegada) o eferente (salida) del páncreas, los conductos pancreáticos o el ámpula de Váter puede precipitar la pancreatitis. Uno de los mecanismos propuestos para la evolución de la pancreatitis se muestra en la Tabla 29-4, aún cuando los factores precisos que llevan a la pancreatitis son desconocidos. Las principales causas de pancreatitis son el abuso de alcohol, especialmente de tipo crónico y las enfermedades del tracto biliar. El alcohol tiene un efecto doble sobre el páncreas, por un lado es estimulante de la secreción pancreática y por otro es irritante de la mucosa duodenal, posiblemente hasta el punto de ocluir el conducto pancreático o el esfínter duodenal. Puede haber incluso tapones proteicos en los conductillos pancreáticos, causados por el alcoholismo y que llevan a la obstrucción pancreática.

Aunque los estudios de necropsias indican que un lito o un tumor obstruyendo el conducto biliar común puede llevar al reflujo de bilis hacia el páncreas y desencadenar la pancreatitis, esto es una causa poco frecuente de la enfermedad. Es más probable que la litiasis vesicular promueva el desarrollo de colecistitis que se extiende e inflama al páncreas. La pancreatitis biliar es en particular común en mujeres ancianas. Una historia de abuso de alcohol o de enfermedades del tracto biliar se encuentra en cerca de 75 % de pacientes con pancreatitis; otras causas importantes de pancreatitis se anotan en el cuadro inferior.

Causas de Pancreatitis Aguda

- Alcoholismo
- Enfermedad del tracto biliar
- Cirugía del páncreas u órganos vecinos
- Placas ateroscleróticas en las arterias pancreáticas
- Trauma abdominal, como una complicación post-cpre
- Desordenes metabólicos como hipertrigliceridemia (especialmente con concentraciones de triglicéridos superiores a 10,000 mg/dl)
- Infecciones

Las drogas asociadas posiblemente causales de pancreatitis son:

- azatioprina
- cimetidina

<ul style="list-style-type: none"> · citarabina · estrógenos · 6-mercaptopurina · metronidazol · pentamidina · sulindac · ácido valproico ref(830) 	<ul style="list-style-type: none"> · didanosina · furosemida · metildopa · nitrofurantoína · sulfonamidas · tetraciclinas

Prevalencia de pancreatitis.

Las enfermedades inflamatorias del páncreas, incluyendo la pancreatitis aguda, el pseudoquistes pancreático o el absceso pancreático son poco comunes. En una serie de 1800 pacientes con dolor abdominal u otros síntomas sugestivos de pancreatitis, ésta sólo se sospechó en 17 casos, la amilasa y lipasa séricas fueron anormales en 188 enfermos, habiéndose confirmado el diagnóstico de enfermedad pancreática en sólo 25 de ellos (1.4%). Sin embargo, el diagnóstico correcto de pancreatitis puede determinar la sobrevida del paciente en algunos casos con enfermedad aguda, dada la oportunidad con que se establece durante el periodo de mayor riesgo. La mortalidad de la pancreatitis es 1.5 por 100,000 habitantes.

Los pacientes con hiperlipidemia tipo 1 de Frederickson-Levy (elevación de triglicéridos) tienen mayor riesgo de desarrollar pancreatitis. La noción antigua de que los triglicéridos elevados ocultan una elevación de la amilasa sérica ya no es correcta con los métodos modernos para amilasa, como aquellos que usan sustratos definidos en técnicas colorimétricas (ver pág.567).

Fármacos asociados con pancreatitis.

Las drogas que se enlistan en el cuadro de abajo han estado asociadas con pancreatitis, causando ocasionalmente la enfermedad. El efecto de la droga se confirma generalmente si después de suspenderlo se readministra el fármaco y la pancreatitis recurre. Esto se ha mostrado varias veces con el ácido valproico, [ref\(831\)](#). Hay muchos otros fármacos con una asociación menos evidente, [ref\(832\)](#).

Patogénesis de la pancreatitis.

Un mecanismo importante en la patogénesis de la pancreatitis aguda es la activación intraglandular de la protripsina. Esto puede ser causado por infecciones en el páncreas o en los órganos proximales, reflujo de jugo pancreático al parénquima, anoxia pancreática y otros factores. La liberación de enzimas proteolíticas activas dentro de la glándula desencadena un ataque autodigestivo, proteolítico sobre la estructura glandular y vasos sanguíneos. El daño de las células acinares y la activación de la enzimas proteolíticas también puede ocurrir como una consecuencia de infecciones virales, endotoxinas, isquemia. Las enzimas lisosomales como la caquexina pueden causar coalescencia intracelular de los gránulos de zimógenos desencadenando la activación prematura de protripsina y otras enzimas dentro de la célula acinar. La activación y liberación de las sustancias vasoactivas probablemente produce choque, colapso respiratorio y muerte en algunos pacientes. La conversión de prekaliceína a

calicreína en los islotes pancreáticos activa quininas y los sistemas de coagulación y de complemento; estos actúan promoviendo la inflamación, trombosis, daño tisular y sangrado.^{ref(833)} Si hay suficiente daño en los vasos sanguíneos pancreáticos como para producir sangrado hacia la cavidad peritoneal, puede presentarse una pancreatitis hemorrágica. La lecitina biliar puede ser convertida en el páncreas por la fosfolipasa A₂ en lisolecitina, una sustancia altamente tóxica que promueve la destrucción de las membranas acinares.

El síndrome de insuficiencia respiratoria del adulto, una complicación grave de la pancreatitis, puede ser causado por la autodigestión de los capilares pulmonares por las enzimas lipolíticas del páncreas que pasan a la circulación sanguínea, tales como la fosfolipasa A₂.^{refs(834)} La pancreatitis aguda fatal se ha descrito como una “quemadura” interna por los hallazgos de las necropsias de daño necrótico e inflamatorio del páncreas, peritoneo, y estructuras asociadas en pacientes que han muerto de pancreatitis. En la mayoría de los casos el páncreas está completamente autolisado. Si las enzimas activadas entran al espacio peritoneal y a la circulación sistémica, los mecanismos de antiproteasas de defensa como alfa-antitripsina y α_2 -macroglobulina pueden ser sobrepasados y/o pueden ocurrir alteraciones en órganos distantes como los pulmones, riñones y paratiroides.

Sólo es posible dar una muy gruesa estimación de la gravedad de la pancreatitis a partir de la cantidad de enzimas pancreáticas en el suero. En algunos pacientes, la inflamación trivial y edema pueden desencadenar grandes aumentos en las actividades séricas de las enzimas pancreáticas; en otros con pancreatitis en estadios terminales las enzimas en el suero pueden ser relativamente bajas por la destrucción glandular. Un gran número de otras enfermedades diferentes a la pancreatitis aumentan tanto amilasa como lipasa, aunque muchos de estos casos podrían tener pancreatitis secundaria no diagnosticada. Las enfermedades que están con frecuencia asociadas con pancreatitis secundarias y con elevaciones séricas de amilasa y lipasa se enlistan en el cuadro de abajo y en la pág.562.

Enfermedades asociados con pancreatitis secundaria	
·	Todos los tipos de enfermedades del tracto biliar
·	Cualquier proceso inflamatorio o absceso en el abdomen
·	Insuficiencia renal
·	Quemaduras
·	Choque
·	Sepsis
·	Cetoacidosis diabética
·	Estado post-quirúrgico
·	Volvolus
·	Perforación gastrointestinal de cualquier tipo
·	Trasplante renal y pancreático

En insuficiencia renal tanto la amilasa como la lipasa están ambas típicamente elevadas, no por enfermedad pancreática sino por insuficiencia de los riñones para excretar amilasa, la vía normal de eliminación y por falla en el metabolismo de lipasa en los túbulos renales, un

proceso catabólico normal para la lipasa.

Entre los datos de mal pronóstico en pacientes con pancreatitis se encuentran la hiperglucemia por menor secreción de insulina o resistencia a ésta, hipotensión, pruebas de función pulmonar anormales, líquido peritoneal con sangre que contiene elevadas cantidades de amilasa, leucocitosis, descenso en el hematocrito causado por hemorragia interna, hipocalcemia, PO_2 de menos de 60 mm Hg, hipoalbuminemia, elevación de la deshidrogenasa láctica, retención de azoados, y edad mayor de 55 años. Cuando varios de estos factores se presentan, el pronóstico es peor. Un curso clínico prolongado y elevación persistente de enzimas pancreáticas sugieren la presencia de un pseudoquistes de páncreas. Los pacientes con pancreatitis crónica que muestran datos de laboratorio de obstrucción biliar, como elevación de fosfatasa alcalina, gama-glutamyltransferasa, y bilirrubina directa, probablemente tengan compresión del colédoco a su paso por la cabeza fibrótica del páncreas.^{ref(835)}

Sensibilidad y especificidad de las pruebas en pancreatitis.

La sensibilidad, especificidad y eficiencia diagnóstica que corresponde a qué tan bien coinciden las pruebas con el diagnóstico, son conocidas para la mayoría de las pruebas de laboratorio comunmente disponibles. Cuando se sospecha la pancreatitis, los estudios que con mayor frecuencia se indican son la amilasa y la lipasa. Una clasificación arbitraria pero que puede ser útil para ordenar las pruebas de la menor a la mayor eficiencia para diagnosticar pancreatitis es como sigue: amilasa urinaria, relación amilasa urinaria/creatinina urinaria, fofolipasa A_2 sérica, amilasa sérica, elastasa pancreática 1, lipasa, amilasa pancreática, lipasa pancreática, isoenzima de lipasa L2, tripsinógeno y tripsina inmunorreactiva.^{refs(836)}

Amilasa urinaria es una prueba pobre para el diagnóstico de pancreatitis porque hay una gran dispersión de valores en personas sanas y por su baja especificidad. La fosfolipasa sérica A_2 , amilasa y lipasa tienen buena sensibilidad pero pobre especificidad, particularmente la primera de éstas. Un valor aislado de amilasa o lipasa moderadamente anormal no es en general de ayuda en un paciente con dolor abdominal, sólo cerca del 15 % de estos pacientes tienen pancreatitis.^{ref(837)} El uso apropiado de las enzimas pancreáticas para diagnosticar pancreatitis incluye estudios repetidos durante las primeras 24 a 48 horas después de la hospitalización. En un paciente con signos y síntomas sugestivos de pancreatitis aguda con amilasa sérica o lipasa mayor que cuatro o cinco veces el límite superior de referencia y con amilasa y lipasa que se mueven en paralelo con el tiempo, el diagnóstico de pancreatitis aguda es altamente probable.^{refs(838)} Si la amilasa es mayor que la lipasa depende de los métodos usados para el ensayo. Por ejemplo, con el de *du Pont aca* (Wilmington, Delaware), la amilasa tiende a ser mayor que la lipasa en pancreatitis, pero con la tecnología de *secado en placa* de Johnson y Johnson (Rochester, New York) ocurre lo contrario.

La sensibilidad y especificidad de cualquiera de las pruebas incluyendo amilasa y lipasa en pancreatitis depende de la exactitud diagnóstica basada en criterios objetivos, algo que no es siempre posible. La sensibilidad y especificidad se afectan por cómo los pacientes fueron seleccionados, el tiempo de la toma de sangre desde el inicio de los síntomas y los métodos usados para las determinaciones de laboratorio. Las sensibilidades y especificidades informadas para amilasa están de 70 a 100 % y de 33 a 89 %, respectivamente; para lipasa son de 63 a 100 % y 34 a 100 %.^{ref(839)} El consenso general es de que la lipasa y amilasa arriba de los límites superiores de referencia (ALSR) son sensibles pero sólo regularmente específicas.

La Fig. 29-5 muestra una curva CRO para la amilasa total, isoenzima P3 de amilasa, lipasa total y la isoforma L2 de lipasa. [ref\(840\)](#) De acuerdo a esta gráfica se puede concluir que los puntos de decisión o de corte afectan tanto a la sensibilidad como a la especificidad y la amilasa P3 o amilasa total son inferiores a la lipasa total o lipasa L2. Para lipasa, aumentando el punto de corte entre lo normal y lo anormal se mejora la especificidad de la prueba con poco efecto sobre la sensibilidad. Los ALSR para amilasa y lipasa no sirven para separar claramente los sanos de los enfermos.

El número de falsos positivos y falsos negativos para amilasa y lipasa en el diagnóstico de pancreatitis aguda es menor cuando el punto de corte o decisión se establece por encima de los ALSR (2 veces y 3 veces ALRS para amilasa y lipasa, respectivamente). [ref\(841\)](#) El valor predictivo para pancreatitis de un aumento moderado de amilasa o lipasa es pobre. Las razones son la baja prevalencia de pancreatitis en esos casos y la baja especificidad de estas pruebas cuando sólo están ligeramente por arriba del límite superior de referencia.

La amilasa tiene 6 isoenzimas, aunque no todas se expresan en la mayoría de los individuos. [ref\(842\)](#) Los principales grupos de isoenzimas de amilasa son el salival y el pancreático, los que fácilmente se separan por electroforesis en acetato de celulosa o en gel de agarosa. Las isoenzimas son de limitada utilidad diagnóstica. Las formas pancreáticas no pueden usarse para discriminar entre varias causas abdominales de un incremento en amilasa total o entre edema y necrosis pancreática. Una excepción posible es la patología de las trompas de falopio en las que predomina la isoamilasa salival más que la pancreática. Desafortunadamente, incluso en caso de un carcinoma seroso ovárico en donde se esperaría un aumento de amilasa salival, ésta no se encuentra elevada en forma consistente, es decir, la prueba tienen poca sensibilidad. [ref\(843\)](#) Las isoamilasas raramente se miden por electroforesis, ya es un método que consume mucho tiempo. Parece ser que la amilasa pancreática obtenida al inhibir la amilasa salival con una proteína de trigo o un anticuerpo específico son mejores pruebas que la determinación de amilasa sérica total.

Causas misceláneas de la elevación de amilasa sérica.

Las enfermedades de las glándulas salivales y de las trompas de falopio, insuficiencia renal, algunos cánceres pulmonares y la macroamilasemia aumentan los niveles de amilasa en el suero. La amilasa tiene una mayor distribución tisular que la lipasa; las glándulas salivales y las trompas de falopio contienen amilasa pero no lipasa. En condiciones normales, la actividad de amilasa en saliva es por lo menos 10 000 veces mayor que en plasma. En los casos de parotiditis (sialoadenitis) y otras enfermedades inflamatorias de las glándulas salivales es común encontrar elevación de la amilasa sérica. En general, esta forma de amilasa está aumentada cuando hay un daño por radiación a las glándulas salivales y en muchas alteraciones ováricas incluyendo el embarazo ectópico. Después de una derivación quirúrgica de las arterias coronarias ('bypass'), la amilasa se eleva frecuentemente por paso de saliva a los pulmones durante la intubación y cirugía y absorción de amilasa al torrente circulatorio; la mayoría de estos pacientes no tienen pancreatitis y después de alrededor de 48 horas, la amilasa regresa a valores normales. En algunos pacientes con cáncer pulmonar puede observarse hiperamilasemia secundaria a la producción tumoral de amilasa salival. [ref\(844\)](#)

Una elevación persistente de amilasa en un sujeto asintomático puede corresponder a macroamilasemia, una curiosidad de laboratorio que generalmente consiste en que la amilasa se une a una inmunoglobulina. [ref\(845\)](#) Los mecanismos normales de depuración de la amilasa se

bloquean y la macroamilasa se acumula en la sangre. Es importante identificar a la macroamilasa para evitar estudios diagnósticos costosos e innecesarios. Después de la electroforesis de la amilasa, la macroamilasa forma una banda distinta a las que producen normalmente la amilasa salival y pancreática. La amilasa en orina está baja en presencia de macroamilasemia.

Pancreatitis crónica.

La pancreatitis crónica es a menudo consecuencia de ataques repetidos de pancreatitis aguda y de la destrucción extensa de la glándula; generalmente gran parte del páncreas es remplazado con tejido cicatricial (fibrótico). Se pueden encontrar tapones proteicos en conductillos, fibrosis pancreática, calcificación, pérdida de la función de células acinares e incluso destrucción de islotes. Puede existir insuficiencia pancreática exocrina y endocrina (DM). Estos pacientes pueden estar en un episodio agudo de inflamación pero no tener anormalidades de laboratorio por la pérdida de gran parte del tejido funcional pancreático. El abuso crónico de alcohol es la causa más común de pancreatitis crónica aún cuando la mayoría de los alcohólicos no la desarrollan. [ref\(846\)](#) Entre las formas no alcohólicas se encuentran la pancreatitis tropical y la pancreatitis familiar hereditaria. La dieta baja en calorías y deficiente de proteínas parece ser un factor predisponente para desarrollar pancreatitis tropical. La sobrealimentación puede provocar un ataque de pancreatitis. La marcada pérdida de peso, hipoalbuminemia, niveles en sangre anormalmente bajos de vitaminas, así como otros signos de desnutrición son datos característicos de la pancreatitis crónica.

Las lesiones ateroscleróticas de la arteria hepática son poco comunes, cuando se presentan llevan a la pérdida gradual y crónica de la función endocrina con atrofia glandular y pérdida total de la actividad pancreática.

Enfermedades destructivas

Fibrosis quística.

La disfunción pancreática exocrina es una característica distintiva de la fibrosis quística (FQ), una enfermedad autosómica recesiva que se manifiesta desde la infancia. La FQ es el resultado de la pérdida o alteración de una proteína de la membrana celular que juega un papel en la captación selectiva de iones a nivel celular. En la FQ, las secreciones pancreáticas son viscosas y de bajo volumen, al igual que las secreciones pulmonares y de otros órganos. Estos cambios llevan a reducir significativamente el flujo del jugo pancreático, a obstruir los conductos y atrofiar el páncreas. Los síndromes de absorción intestinal deficiente (ver pág. 580) y la desnutrición pueden ocurrir a pesar de tener una dieta adecuada. El diagnóstico de FQ se basa en el hallazgo de defectos genotípicos usando técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), [ref\(847\)](#) una prueba anormal de cloro en sudor, pruebas de función pancreática anormales, padecimiento pulmonar característico y una historia familiar de la enfermedad. Los defectos cromosómicos son multifacéticos y dependientes del error genético, pudiendo presentarse la FQ con grados variables de gravedad, desde leve hasta letal.

Enfermedades infecciosas.

Las infecciones son tanto causa como complicación de la pancreatitis. Entre los agentes causales que se han considerado se incluye al virus de la parotiditis, echovirus, virus de la hepatitis A y B, virus Epstein-Barr, virus coxsackie B, VIH, parasitosis por *Ascaris* (lombriz



redonda intestinal que causa ascaridiasis) y bacterias como *Mycoplasma*. La pancreatitis aguda se ha observado en niños infectados por VIH, a pesar de que normalmente es rara.[ref\(848\)](#) La aparición de pancreatitis en un niño con SIDA es presagio de muerte inminente. Las drogas que se usan en los pacientes con SIDA, tales como isetianato de pentamidina y didanosina tienden también a provocar pancreatitis.[refs\(849\)](#)

Neoplasias pancreáticas

Adenocarcinoma.

La mayoría de los cánceres son adenocarcinomas originados en las células del epitelio ductal y tienen un pronóstico ominoso. Sólo cerca del 1% de cánceres de páncreas se originan en las células acinares. En los países desarrollados, el cáncer de páncreas ocupa el quinto lugar de mortalidad entre las neoplasias malignas, después del cáncer colorrectal, de mama, pulmón y próstata.[ref\(850\)](#) Los factores predisponentes que se han identificado son el tabaquismo, diabetes mellitus, dieta rica en grasa y la exposición a carcinógenos como el alquitrán de hulla, coque, bencidina y β -naftilamina. Puede reducirse el riesgo de cáncer de páncreas al dejar de fumar y reducir el consumo de grasas en la dieta. El cáncer pancreático es extremadamente raro en vegetarianos. Los fumadores tienen de dos a tres veces mayor incidencia de carcinoma pancreático. No se ha confirmado la asociación entre el consumo de café y el cáncer de páncreas que se llegó a sospechar.

La mayoría de los cánceres pancreáticos son invasores y cuando se encuentran no son operables. Es común que la muerte ocurra dentro del primer año del diagnóstico y la sobrevida a 5 años es de un funesto 1 %. La ictericia se desarrolla precozmente en 60 a 70 % de los pacientes con cáncer en la cabeza del páncreas por la oclusión que produce el tumor sobre la vía biliar. En el carcinoma del cuerpo o cola del páncreas, la ictericia aparece tardíamente. La absorción deficiente de grasas y proteínas con pérdida de peso es un hallazgo común. Excepcionalmente, una investigación etiológica de ictericia puede revelar un cáncer pancreático curable por cirugía. La tasa de mortalidad en Estados Unidos está aumentando y es de cerca de 12 por 100,000.

La identificación de recidiva de cáncer pancreático es posible con pruebas como la proteína pancreática fetoacinar; el antígeno asociado al cáncer pancreático (CA 19-9), antígeno carcinoembrionario, galactosiltransferasa, CA-50 o DU PAN-2. No existen pruebas satisfactorias para escrutinio de cáncer pancreático y muchas condiciones patológicas benignas agudas pueden dar resultados anormales en las determinaciones antes mencionadas.[ref\(851\)](#)

Tumores de células insulares.

La producción ectópica de hormonas es muy común en tumores insulares; cerca de 20 % de los tumores de las células de islotes son silenciosos bioquímicamente y no secretores. Se ha encontrado que los tumores de las células de los islotes pancreáticos secretan una o más de las siguientes hormonas: ACTH, gonadotropina coriónica β , péptido C, calcitonina, gastrina, glucagón, insulina, paratohormona, prostaglandinas, secretina, serotonina, somatostatina y PIV.[refs\(852\)](#) En casi todos los casos los pacientes presentan trastornos endocrinos significativos.

Los tumores productores de gastrina o gastrinomas, originados en las células G de los islotes son los más frecuentes y producen el bien conocido síndrome de Zollinger Ellison (ZES), que incluye la estimulación no controlada de las células parietales del estómago y secreción excesiva y continua de HCl. Esto último generalmente lleva al desarrollo de grave

ulceración gástrica y duodenal, hasta el punto de hemorragia o perforación.^{ref(853)} La mayoría de los gastrinomas son malignos y usualmente metastatizan al hígado, aorta abdominal y otras estructuras vecinas. Casi un 10 % de los gastrinomas están localizados sólo en el duodeno, la mayoría están en el páncreas y algunos en ambos. Una prueba provocativa en pacientes con ZES consiste en administrar secretina intravenosa que produce un aumento dramático en la gastrina plasmática que no ocurre en personas normales (ver pág. 582). Los tumores de las células G probablemente se originan de las células α , β o δ de los islotes.

Los tumores de las células beta son los que siguen en prevalencia y algunos de ellos secretan insulina en cantidades incontroladas. Las concentraciones plasmáticas de glucosa caen abajo de 2.8 mmol/L en vista de que no hay un mecanismo de autorregulación que desactive la secreción de insulina. La mayoría de los tumores de las células β son benignos aun cuando la hipoglucemia profunda puede amenazar la vida de los pacientes. El diagnóstico de estos tumores se hace en gran parte, por la demostración de concentraciones elevadas de insulina en el plasma después de un período de ayuno.

Los tumores de las células- α secretores de glucagón son raros; los pacientes generalmente se presentan con DM leve, pérdida de peso, anemia y elevadas concentraciones de glucagón circulante. Más de la mitad de las neoplasias son malignas. Los tumores de células delta son muy raros. Algunos secretan somatostatina, que produce la inhibición de otras células de islotes pancreáticos y de células del tubo digestivo que secretan CCK y gastrina. Alrededor de la mitad de los casos son malignos y tienen metástasis hepáticas.

Los tumores D1 o vipomas secretan PIV, una hormona que normalmente no se produce en el páncreas. Los pacientes presentan diarrea acuosa abundante, hipokalemia, acidosis, bicarbonato plasmático bajo y reducida secreción de HCl en el estómago. Algunos de ellos son malignos. Los somatostatinomas son raros. Los tumores contienen gránulos como “N células δ ” en cerca del 60 % de los pacientes. La hipersomatostatinemia generalmente lleva a DM leve, esteatorrea, absorción intestinal deficiente, baja en el HCl gástrico y diarrea acuosa que refleja los efectos inhibitorios de la somatostatina sobre las células endocrinas y la función gastrointestinal. El diagnóstico se facilita al demostrar aumento en las concentraciones de somatostatina circulante. Los tumores carcinoides son raros, producen serotonina y el síndrome carcinoide típico.^{ref(854)}

Neoplasia endocrina múltiple.

El páncreas endocrino está casi siempre involucrado con el tipo I de las neoplasias endocrinas múltiples (MEN), una enfermedad devastadora. Los hallazgos comunes en este frecuente síndrome se enlistan en el cuadro inferior.

El síndrome MEN I se hereda en una forma autosómica dominante, es decir, la enfermedad se expresa cuando el paciente es heterocigoto u homocigoto para el gen anormal. El diagnóstico es muy difícil por la presentación clínica tan diversa del tipo I (en el tipo II no se encuentra comprometido el páncreas);^{ref(855)} sin embargo, el hallazgo de concentraciones anormales de las secreciones endocrinas de los órganos antes mencionados es de gran utilidad. En algunos pacientes con MEN tipo I, una comida estandarizada produce respuesta exagerada de polipéptido pancreático y gastrina.^{ref(856)} También existe interacción de otras secreciones hormonales como en condiciones normales: elevadas concentraciones de ACTH aumentan la concentración de cortisol que tiene un efecto anti-insulina y es así que estimula a los islotes



pancreáticos para secretar más insulina.

Características comunes del síndrome de neoplasia endocrina múltiple (NEM tipo I)

- Hiperpituitarismo
- Carcinoma medular de tiroides y ocasionalmente concentraciones extraordinarias de calcitonina circulante
- Hiperparatiroidismo
- Hiperplasia adrenocortical
- Hiperinsulinismo
- Úlcera péptica.

Resumen

El páncreas puede ser la “glándula maestra” del cuerpo si se consideran los graves trastornos digestivos y metabólicos que aparecen cuando se pierden sus funciones exocrinas y endocrinas. El principal trastorno al que conduce la pérdida de la función endocrina es la diabetes mellitus, que cuenta con mayor morbilidad y mortalidad que todas las otras enfermedades pancreáticas juntas. Las pruebas de laboratorio importantes a este respecto, son la determinación de glucosa en sangre, fructosamina y hemoglobina A_{1c} con objeto de conocer el control glucémico a corto y largo plazo. La pérdida de la función exocrina es común en la fibrosis quística y en algunos sujetos con ataques repetidos de pancreatitis generalmente causados por el abuso crónico del alcohol. El páncreas tiene una gran reserva y la pérdida de la función produce síntomas sólo después de que 85% de las células acinares se ha perdido. Existen algunas pruebas de función pancreática que junto con la de grasa en materia fecal son las más importantes. Las pruebas en suero, como la tripsina inmunorreactiva, son las menos sensibles y menos específicas a pesar de ser las más fáciles de realizar.

La pancreatitis aguda es una de las principales emergencias médicas; el alcoholismo y las enfermedades del tracto biliar son las causas predominantes, aunque sólo tenemos algunas evidencias conjeturales de cómo se inicia una pancreatitis. Los cambios observados en las enzimas pancreáticas como amilasa y lipasa pueden ser de moderados a intensos, desafortunadamente sólo es posible obtener una estimación gruesa de la gravedad del padecimiento con los estudios de laboratorio. La pancreatitis crónica generalmente es la secuela de múltiples brotes de la enfermedad aguda y los resultados de laboratorio normalmente no son muy útiles para el diagnóstico. El adenocarcinoma de páncreas, la forma común de la enfermedad maligna, es funesta para casi todos los pacientes debido a la naturaleza invasiva del cáncer y su progresión rápida y silenciosa. No existen pruebas adecuadas de escrutinio para el cáncer pancreático y la muerte se presenta típicamente de seis meses a un año del diagnóstico. Los neoplasias de los islotes de Langerhans son un reto bioquímico para su diagnóstico. Excepto los gastrinomas que producen el síndrome de



Zollinger-Ellison, la mayoría de estos tumores no son malignos pero pueden poner en peligro la vida debido a la liberación no controlada de factores endocrinos y la estimulación a sus órganos blancos. Para establecer el diagnóstico se requiere realizar pruebas que determinen las hormonas normalmente producidas en las células del islote de Langerhans y otros factores.

Métodos de Análisis

Amilasa

Steven C. Kazmierczak

Principios del análisis y uso actual.

Se han desarrollado numerosas técnicas para determinar la actividad de la amilasa. Cualquier método que se utilice debe cumplir con un pH óptimo de 6.9 a 7.0 e incluir calcio y cloro como cofactores enzimáticos. Las diversas técnicas utilizadas para la determinación de amilasa están agrupadas en varias categorías.

Tienen interés histórico las técnicas que miden viscosidad, las cuales determinan la actividad de la amilasa en base a la capacidad de la enzima para romper una suspensión de moléculas de almidón en pequeños fragmentos. Al romperse el sustrato de almidón en pequeños fragmentos, disminuye la viscosidad de la solución. El cambio de viscosidad medido antes y después de un periodo de incubación es proporcional a la actividad de la enzima.

El método yodométrico, también llamado amiloclástico, es una técnica que constituye otro procedimiento que es predominantemente sólo de interés histórico. Estos métodos tienen su fundamento en la producción de color producido después de la reacción entre el yodo y el almidón. Una solución de almidón que se le permite reaccionar con la amilasa, producirá un cambio de color menos intenso después de agregarle yodo. Así, a mayor cantidad de amilasa presente en la muestra, más claro será el color producido después de agregarle yodo al sustrato de almidón.

Los métodos turbidimétricos para la determinación de amilasa (Tabla 29-5, método 1) emplean un sustrato de almidón suspendido en un medio acuoso para producir una solución turbia con una absorbancia aproximada de 1.000. La amilasa degrada el sustrato, dando lugar a una disminución en la turbidez. Desafortunadamente, las variaciones en la consistencia del sustrato hacen difícil estandarizar el método. La acción de la amilasa sobre el sustrato puede también ser registrada a través de nefelometría.[ref\(857\)](#)

Una técnica muy popular utilizada para la determinación de amilasa es la que emplea métodos sacarogénicos que miden la formación de monosacáridos o disacáridos liberados de la reacción resultante de la amilasa y un sustrato de polisacárido definido. En una técnica parecida a la anterior (Tabla 29-5, método 2), la amilasa reacciona con el sustrato para producir el disacárido maltosa. Este disacárido reacciona con la maltasa para producir glucosa y entonces ésta puede ser medida por una gran variedad de técnicas enzimáticas. La cantidad de glucosa que se produce es representativa de la actividad de amilasa. La glucosa endógena presente en la muestra del paciente debe ser tomada en cuenta cuando se utilice este tipo de métodos.

Los métodos que se usan con mayor frecuencia para determinar amilasa son en conjunto conocidos como “técnicas cromolíticas” (Tabla 29-5, método 3). Estos métodos se

basan en la capacidad de la amilasa para liberar un colorante previamente unido al polisacárido definido que se usa como sustrato. En una de estas técnicas, el colorante *p*-nitrofenol está unido al sustrato maltoheptaosido^{ref(858)} y la formación del color amarillo producido por el *p*-nitrofenol proveniente del sustrato puede ser registrada a 405 nm. Algo similar ocurre al utilizar métodos de *secado en placa* (dry-film), procedimiento en el cual la actividad de amilasa se registra después de la hidrólisis de un colorante rojo a partir de un sustrato de almidón. La liberación de fragmentos coloreados se difunden en una capa reactiva, donde después son medidos por fotometría. El colorante que no se libera del sustrato, permanece oculto en la otra capa del gel.

Para finalizar, una técnica menos frecuente para medir actividad de amilasa usa fluorescencia polarizada (Tabla 29-5, método 4).^{ref(859)} En este procedimiento, una molécula de amilosa de alto peso molecular marcada con fluoresceína se utiliza como sustrato. Así, la molécula que es relativamente grande gira relativamente lenta en solución, y la luz polarizada que interactúa con la fluoresceína marcada será entonces reemitida como luz polarizada fluorescente. La amilasa presente en una muestra degradará la molécula de amilosa en moléculas más pequeñas. Estas moléculas más pequeñas de amilosa giran más rápidamente, provocando luz fluorescente que se emite de la molécula de fluoresceína para ser despolarizada. Es así que a mayor actividad de amilasa presente en la muestra, es mayor la cantidad de luz fluorescente emitida que es despolarizada.

Muestras.

Cualquier muestra de suero o de plasma con heparina puede ser utilizada.^{ref(860)} Sin embargo, en un estudio se encontró que cuando la actividad de la amilasa se mide usando la técnica de *secado en placa*, las muestras de plasma con heparina alcanzan valores significativamente más altos que las muestras de suero.^{ref(861)} La amilasa requiere iones de calcio y cloro como cofactores. Así, el uso de anticoagulantes quelantes como citrato, oxalato y ácido etilendiaminotetracético no se acepta. La orina no debe ser acidificada cuando se va a medir la actividad de amilasa.

La amilasa es una enzima extremadamente estable. En muestras de suero y orina libres de contaminación bacteriana, la amilasa es estable hasta una semana a temperatura ambiente y varios meses a 4° C.^{ref(862)}

Valores de referencia.

Los intervalos de referencia difieren entre los ensayos comercialmente disponibles, debido a las diferencias en los sustratos utilizados y en la preparación de reactivos.^{ref(863)} Los valores de referencia dados por un equipo comercial disponible y que utiliza una técnica colorimétrica son <88 U/L. La actividad de la amilasa en recién nacidos es aproximadamente una quinta parte de la que se encuentra en adultos, los niveles de amilasa en estos últimos se alcanzan generalmente a partir de los 3 ó 4 años de edad.^{ref(864)} No se han observado diferencias en actividades de amilasa relacionadas con el género.^{ref(865)}

Lipasa

Steven C. Kazmierczak

Principio del análisis y uso actual.

Las lipasas hidrolizan las cadenas largas de ácidos grasos de los triglicéridos al actuar sobre los enlaces ésteres de los ácidos grasos/glicerol que existen *sólo* en la interfase éster-agua. Entre mayor sea el área superficial de la emulsión de ácidos grasos más rápida será la reacción de la enzima con el sustrato.

Los primeros ensayos prácticos para medir lipasa usaron la titulación de ácidos grasos liberados por la acción de la lipasa en una emulsión de aceite de oliva y goma arábiga. La titulación se realizó con una solución de NaOH 0.05 M, utilizando como indicador fenoftaleína.^{ref(866)} El procedimiento original de titulación tomó 24 horas para completarse y por lo tanto no se propuso como una técnica de pH estático (*"pH stat"*). Se ha desarrollado un análisis de punto final con potenciómetro,^{ref(867)} así como también una técnica de titulación automática a pH estático que considera el cambio de pH conforme se liberan los ácidos grasos del sustrato de aceite de oliva.^{ref(868)} Desafortunadamente, esas técnicas de titulación requieren de destreza y equipo especial, haciéndolas poco disponibles para la mayoría de los laboratorios.

Uno de los métodos más frecuentemente utilizados hoy en día, emplea técnicas turbidimétricas o nefelométricas, que registran la disminución en la turbidez de una emulsión con aceite de oliva, como resultado de la acción de la lipasa sobre el sustrato (Tabla 29-6, método 1).^{ref(869)} Se requiere un sustrato altamente estable y reproducible que demuestre una apropiada absorbancia inicial. Aproximadamente del 3% al 5% de las muestras analizadas por la técnica de aclaramiento o depuración de la emulsión mostrarán un aumento anormal de absorbancia, debido a la agregación de componentes de la muestra.^{ref(870)} Se ha demostrado que el factor reumatoide es uno de los componentes de la muestra que pueden agregarse. Con el fin de minimizar este fenómeno, la muestra puede ser pre-tratada con polietilén glicol para precipitar inmunoglobulinas.

Otro procedimiento comúnmente utilizado para medir lipasa es el empleo de acoplamiento enzimático. La lipasa hidroliza los ácidos grasos del sustrato formado por diglicéridos o triglicéridos para formar glicerol libre. El glicerol producido puede ser cuantificado y relacionado a la actividad de lipasa presente en la muestra (Tabla 29-6, método 2a).

Un ensayo de acoplamiento enzimático utiliza una cadena soluble y larga de ácidos grasos 1,2-diglicérido obtenido de lecitina de huevo.^{ref(871)} La lipasa rompe el sustrato para formar 2-monoglicérido y ácidos grasos. El 2-monoglicérido es hidrolizado a glicerol por una lipasa específica 2-monoglicérido. El indicador final de la reacción, es el cromógeno del sustrato, el cual es 4-amino-fenazona/*N*-etil-*N*-(2-hidroxi-3-sulfopropil-*m*-toluidina) o TOOS, que es oxidado a color violeta, con un máximo de absorbancia a 550 nm (Tabla 29-6, método 2b).^{ref(872)}

Estos ensayos de acoplamiento enzimático que se fundamentan en la medición de glicerol libre, pueden verse afectados de manera adversa si la muestra del paciente contiene concentraciones elevadas de glicerol libre. Se ha encontrado que ciertas drogas y medicamentos contienen concentraciones altas de glicerol libre.^{ref(873)} Sin embargo, si se espera un periodo adecuado de tiempo antes de medir el glicerol formado, el glicerol endógeno debe consumirse y ya no interferir con el ensayo.

Diversas técnicas inmunoquímicas también se han desarrollado. Estas incluyen un

procedimiento semicuantitativo de aglutinación con látex, en el cual los anticuerpos antilipasa se unen a las partículas de látex que se mezclan con la muestra. Si la lipasa está presente, los acúmulos de partículas aparecerán en la placa de reacción.^{ref(874)} También se ha descrito una técnica de inmunoactivación no competitiva que es específica para la lipasa pancreática.^{ref(875)} Este ensayo utiliza fragmentos de anticuerpos Fac contra la lipasa pancreática, los cuales se unen en forma covalente a la peroxidasa de rábano. En presencia de lipasa pancreática, la peroxidasa cataliza la reacción productora de color, cuya intensidad es proporcional a la actividad de lipasa presente en la muestra.

En la actualidad, casi todos los ensayos de lipasa disponibles emplean el cofactor colipasa. La colipasa optimiza la reacción de lipasa al facilitar de manera más eficiente la interacción de la enzima con el sustrato. El cloruro de calcio (8.5 $\mu\text{mol/L}$), el glicocolato de sodio (35 mmol/L) y una sal biliar, también se agregan a la mayoría de los equipos comerciales con el fin de mejorar la actividad de la lipasa.^{ref(876)} Cuando se realiza la medición de lipasa con los equipos actuales que usan celdillas de reacción reutilizables, se debe tener especial precaución para prevenir contaminación proveniente de la lipasa que pudiera estar presente en muchos de los reactivos comerciales. La lipasa se agrega como un “factor de depuración” en muchos reactivos con el fin de evitar interferencia proveniente de la turbidez de la muestra. Además, antes de realizar una determinación de lipasa, es necesario hacer un lavado especial de las celdillas con una solución alcalina con el objeto de remover restos de lipasa presentes en reactivos previos.

Muestra.

Pueden usarse muestras de suero y plasma, ya que los resultados son comparables en ambas.^{ref(877)} Las muestras deben almacenarse a 4° C hasta su análisis. Se deben evitar descongelaciones y congelaciones repetidas. La actividad de la lipasa generalmente no está presente en orina, a menos que la integridad del aparato glomerular esté comprometido.

Valores de referencia.

Los intervalos de referencia para la actividad de la lipasa en individuos normales y sanos depende del método utilizado. El límite de referencia superior para los procedimientos turbidimétricos es aproximadamente de 200 U/L, mientras que el límite superior de referencia para los ensayos colorimétricos es aproximadamente 60U/L. La actividad de la lipasa en suero permanece relativamente constante hasta cerca de la sexta década de la vida, cuando los valores pueden aumentar como en un 20% sobre los niveles normales establecidos. No existen diferencias en la actividad de lipasa relacionadas con el género.

Agradecimientos.

Nuestro agradecimiento para Michael D.D: McNeely, anterior autor de los métodos de amilasa y lipasa.

Referencias

1. Ganong WF: Endocrine functions of the pancreas and the regulation of carbohydrate metabolism. In *Review of medical physiology*, ed 15, Norwalk, Conn., 1991, Appleton & Lange.



2. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL: The endocrine pancreas. In *Robbins pathologic basis of disease*, Philadelphia, 1989, Saunders.
3. Go VLW: Pancreatic secretion. In Stein JH, editor: *Internal medicine*, Boston, 1990, Little, Brown & Co, pp 434-438 and 446-450.
4. Ackermann U: *Essentials of human physiology*, St. Louis, 1992, Mosby, pp 121-123.
5. Scarpelli DG: The pancreas. In Rubin E, Farber JL, editors: *Essential pathology*, Philadelphia, 1990, Lippincott, pp 445-455.
6. Steinberg W: Pancreatitis. In Wyngaarden JB, Smith LH Jr, Bennett JC, editors: *Cecil textbook of medicine*, ed 19, Philadelphia, 1992, Saunders, vol 1.
7. Greenberger NS, Toskes PP, Isselbacher KJ: Acute and chronic pancreatitis. In Wilson JD, Braunwald E, Isselbacher KJ, et al, editors: *Harrison's principles of internal medicine*, ed 12, New York, 1991, McGraw-Hill.
8. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL: The exocrine pancreas. In *Robbins pathologic basis of disease*, Philadelphia, 1989, Saunders.
9. Lott JA, Patel ST, Sawhney K, et al: Assays of serum lipase: analytical and clinical considerations, *Clin Chem* 32:1290-1302, 1986.
10. Ganong WF: Regulation of gastrointestinal function. In *Review of medical physiology*, ed 15, Norwalk, Conn., 1991, Appleton & Lange.
11. Gullo L, Pezzilli R, Bellanova B, et al: Influence of the thyroid on exocrine pancreatic function, *Gastroenterology* 100:1392-1396, 1991.
12. Lembecke B, Creutzfeldt W, Schleser S, et al: Effect of the somatostatin analogue Sandostatin (SMS 201-995) on gastrointestinal, pancreatic and biliary function and hormone release in normal men, *Digestion* 36:108-124, 1987.
13. Sarles J. Current techniques for investigating exocrine pancreatic function in children, *Ann Pediatr Paris* 39:221-225, 1992.
14. Lu L, Louie D, Owyang C: A cholecystokinin releasing peptide mediates feedback regulation of pancreatic secretion, *Am J Physiol* 256:G430-G435, 1989.
15. Schmidt WE, Creutzfeldt W, Hocker M, et al: Cholecystokinin receptor antagonist loxiglumide: influence on bilio-pancreatic secretion and gastrointestinal hormones in man, *Digestion* 46 (suppl 2):232-239, 1990.
16. Owyang C, Louie DS, Tatum D: Feedback regulation of pancreatic enzyme secretion: suppression of cholecystokinin release by trypsin, *J Clin Invest* 77:2042-2047, 1986.
17. Lott JA, Ellison EC, Applegate D: The importance of objective data in the diagnosis of pancreatitis, *Clin Chim Acta* 183:33-40, 1989.
18. Bolinder J, Wahrenberg H, Persson A, et al: Effect of pancreas transplantation on glucose counterregulation in insulin-dependent diabetic patients prone to severe hypoglycaemia, *J Intern Med* 230:527-533, 1991.
19. Landgraf R, Nusser J, Riepl RL, et al: Metabolic and hormonal studies of type 1 (insulin-dependent) diabetic patients after successful pancreas and kidney transplantation, *Diabetologia* 34 (suppl 1):S61-S67, 1991.
20. Speicher CE: *The right test, a physician's guide to laboratory medicine*, ed 2, Philadelphia, 1993, Saunders, pp 122-126.
21. Lott JA: Enzyme tests in gastroenterology. In Moss DW, Rosalki SB, editors: *Principles and practice of diagnostic enzymology*, ed 2, London, 1995, Edward Arnold Publishers.
22. Lott JA: Pancreatic disorders, *Anal Chem* 63:176R-180R, 1991.
23. Waters DL, Dorney SFA, Gaskin KJ, et al: Pancreatic function in infants identified as having cystic fibrosis in a neonatal screening program, *N Engl J Med* 322:303-308, 1990.
24. Lott JA, Bond LW, Bobo RC, et al: Valproic acid-associated pancreatitis: report of three cases and a brief review, *Clin Chem* 36:395-397, 1990.
25. Young DS: *Effects of drugs on clinical laboratory tests*, ed 4, Washington, D.C., 1995, American



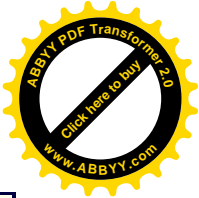
- Association for Clinical Chemistry Press, pp 3.34-3.36.
26. Lott JA, Lu CJ: Lipase isoforms and amylase isoenzymes: assays and application in the diagnosis of acute pancreatitis, *Clin Chem* 37:361-368, 1991.
 27. Wong ECC, Butch AW, Rosenblum JL, et al. The clinical chemistry laboratory and acute pancreatitis, *Clin Chem* 39:234-243, 1993.
 28. Zweig MH, Campbell G: Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine, *Clin Chem* 39:561-577, 1993.
 29. Lott JA: Amylase. In Lott JA, Wolf PL, editors: *Clinical enzymology: a case-oriented approach*, St. Louis, 1986, Mosby.
 30. Bruns DC, Mills SE, Savory J: Amylase in fallopian tube and serous ovarian neoplasms: immunohistochemical localization, *Arch Pathol Lab Med* 106:17-20, 1982.
 31. Mifflin TE, Forsman RW, Bruns DE: Interaction of immobilized anti-salivary amylase antibody with human macroamylases: implications for use in a pancreatic amylase assay to distinguish macroamylasemia from acute pancreatitis, *Clin Chem* 35:1651-1654, 1989.
 32. Beaudet A, Bowcock A, Buchwald M, et al: Linkage of cystic fibrosis to two tightly linked DNA markers: joint report from a collaborative study, *Am J Hum Genet* 39:681-693, 1986.
 33. Miller TL, Winter HS, Luginbuhl LM, et al: Pancreatitis in pediatric human immunodeficiency virus infection, *J Pediatr* 120:223-227, 1992.
 34. Shelton MJ, O'Donnell AM, Morse GD: Didanosine, *Ann Pharmacother* 26:660-670, 1992.
 35. Bonacini M: Pancreatic involvement in human immunodeficiency virus infection, *J Clin Gastroenterol* 13:58-64, 1991.
 36. DiMagno EP: Carcinoma of the pancreas. In Wyngaarden JB, Smith LH Jr, Bennett JC, editors: *Cecil textbook of medicine*, ed 19, Philadelphia, 1992, Saunders.
 37. Grunfeld C: Pancreatic islet cell tumors. In Wyngaarden JB, Smith LH Jr, Bennett JC, editors: *Cecil textbook of medicine*, ed 19, Philadelphia, 1992, Saunders.
 38. Skogseid B, Oberg K, Benson L, et al: A standardized meal stimulation test of the endocrine pancreas for early detection of pancreatic endocrine tumors in multiple endocrine neoplasia type 1 syndrome: five years' experience, *J Clin Endocrinol Metab* 64:1233-1240, 1987.
 39. Caraway WT: A stable starch substrate for the determination of amylase in serum and other body fluids, *Am J Clin Pathol* 32:97-99, 1959.
 40. Liu TZ, Wei JS: Rapid laser nephelometric determination of amylase activity in serum and urine, *J Formosan Med Assoc* 90:217-220, 1991.
 41. Okabe H, Uji T, Netsu K, Noma A: Automated measurement of amylase with 4-nitrophenylmaltoheptaoside as a substrate and use of a selective amylase inhibitor, *Clin Chem* 30:1219-1222, 1984.
 42. Hofman M, Shaffer M: Fluorescence depolarization assay for quantitative α -amylase in serum and urine, *Clin Chem* 31:1478-1480, 1985.
 43. Gillard BK, Simbala JA, Goodglick L: Reference intervals for amylase isoenzymes in serum and plasma of infants and children, *Clin Chem* 29:1119-1123, 1983.
 44. Dumas BT, Hause LL, Simuncak DM: Differences between values for plasma and serum in tests performed in the Ektachem 700 XR analyzer, and evaluation of "plasma separator tubes (PST)," *Clin Chem* 35:151-153, 1989.
 45. Henry RJ: *Clinical chemistry: principles and techniques*, ed 4, New York, 1964, Harper & Row.
 46. Chen CT, Dineen H, Newton JD: Specificity of different substrates used in three amylase assays, *Clin Chem* 34:1363-1364, 1988.
 47. Cherry IS, Crandall IA Jr: The specificity of pancreatic lipase: its appearance in the blood after pancreatic injury, *Am J Physiol* 100:266-273, 1932.
 48. Tietz NW, Fiereck EA: Measurement of lipase in serum. In Cooper GR, editor: *Standard methods of clinical chemistry*, vol 7, New York, 1972, Academic Press.

49. Cerolotti F, Bonini PA, Murone M, et al. Measurement of lipase activity by differential technique, *Clin Chem* 31:257-260, 1985.
50. Zinterhofer L, Wardlaw S, Jatlow P, Seligson D: Nephelometric determination of pancreatic enzymes. II. Lipase, *Clin Chim Acta* 44:173-178, 1973.
51. Kannisto J, Lalla M, Lukkari E: Characterization and elimination of a factor in serum that interferes with turbidimetry and nephelometry of lipase, *Clin Chem* 29:96-99, 1983.
52. Robbrecht JH, DeBuyzere ML, Delanghe JR: Wake UV colorimetric pancreatic lipase assay with 1,2-dilinoleoylglycerol as substrate evaluated, *Clin Chem* 35:1540-1541, 1989.
53. Fassati P, Ponti M, Paris P, et al: Kinetic colorimetric assay of lipase in serum, *Clin Chem* 38:211-215, 1992.
54. Bilodeau L, Grotte DA, Preese LM, et al: Glycerol interference in serum lipase assay falsely indicates pancreas injury, *Gastroenterology* 103:1066-1067, 1992.
55. Moller-Peterson J, Klaerke M, Dati F, et al. Immunochemical qualitative latex agglutination test for pancreatic lipase in serum evaluated for use in diagnosis of acute pancreatitis, *Clin Chem* 31:1207-1210, 1986.
56. van Ingen HE, Sanders GTB: Clinical evaluation of pancreatic lipase mass concentration assay, *Clin Chem* 38:211-215, 1992.
57. Tietz NW, Astles JR, Shuey DF: Lipase activity measured in serum by a continuous-monitoring pH-stat technique-an update, *Clin Chem* 35:1688-1693, 1989.
58. Dumas BT, Hause LL, Simuncak DM, et al: Differences between values for plasma and serum in tests performed in the Ektachem 700 XR analyzer, and evaluation of "plasma separator tubes (PST)," *Clin Chem* 35:151-153, 1989.

Tablas

Tabla 29-1. Hormonas producidas normalmente en las células de los islotes pancreáticos.

Célula:	Alfa
Hormona:	Glucagón (3500)
Liberación estimulada por:	Glucosa plasmática baja, sistema nervioso simpático, epinefrina, cualquier factor que disminuya la glucosa en sangre
Liberación inhibida por:	Somatostatina, glucosa, secretina, insulina
Efecto de la hormona:	Aumento de glucosa en plasma por estimulación hepática de la glucogenólisis, gluconeogénesis, lipólisis del tejido adiposo; movilización de los aminoácidos
Célula:	Beta
Hormona:	Proinsulina (11,500) Insulina (5374) Péptido C (31 aminoácidos)
Liberación estimulada por:	Glucosa en plasma por arriba de 1000 mg/L, cetoácidos, arginina, leucina y estimulación



	del sistema nervioso simpático y parasimpático, polipéptido inhibidor gástrico, gastrina, secretina, CCK, glucagón, cortisol, hormona de crecimiento, tiroxina, progesterona, hormonas sexuales, sulfonilureas
Liberación inhibida	
por:	Agonistas alfa-adrenérgicos, somatostatina, insulina, diuréticas tiazidas, fenitoín
Efecto de la hormona:	Captación de glucosa por el hígado, músculo, tejido adiposo; inhibición de la gluconeogénesis, formación de glicógeno; síntesis y almacenamiento de las grasas; inhibición de movilización & oxidación de grasas; conversión de glucosa a ácidos grasos o colesterol; producción de acetil CoA; síntesis de proteínas; inhibición de la hidrólisis de proteínas; incremento de la síntesis de RNA; entrada de iones de K, fosfato, Mg al células hepáticas y músculo
Célula:	Delta
Hormona:	Somatostatina (1640)
Liberación estimulada	
por:	Ingestión de alimentos, aumento de glucosa en plasma, arginina, leucina, CCK
Liberación inhibida	
por:	Desconocida
Efecto de la hormona:	Inhibe la liberación de insulina y glucagón, inhibición de secreciones gástrica y pancreática exocrina.
Célula:	F
Hormona:	Polipéptido pancreático (36 aminoácidos)
Liberación estimulada	
por:	Ingestión de alimentos, en especial de proteínas; ayuno; ejercicio; hipoglicemia
Liberación inhibida	
por:	Hiperglicemia
Efecto de la hormona:	Disminución en la absorción de alimentos, estimulación de la secreción enzimática gástrica e intestinal, inhibición de la motilidad intestinal.
CCK, Colecistocinina.	
*En paréntesis, los pesos moleculares en daltones.	

Tabla 29-2. Factores que controlan la secreción pancreática exocrina normal. [refs\(878\)](#)

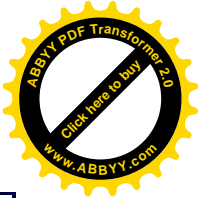
Evento o liberación de factor	Resultado
Estimulación vagal del páncreas	Secreción de líquido rico en



		proteínas y enzimas (como tripsina), pobre en bicarbonato, bajo en volumen; liberación de polipéptidos pancreáticos.
Distensión del duodeno por alimentos; ingestión de alcohol	Secreción de gastrina y CCK por el duodeno.	
Liberación de gastrina o CCK	Liberación de gránulos de zimógeno de las células acinares; secreción de líquido rico en proteínas y enzimas, pobre en bicarbonato, bajo en volumen, liberación de polipéptido pancreático.	
Liberación de secretina	Secreción de líquido rico en bicarbonato y volumen, pero pobre en enzimas.	
Ingestión de ácidos grasos o alimentos	Liberación de CCK.	
Ingestión de aminoácidos o Ca^{++}	Liberación de gastrina y CCK.	
Liberación de polipéptido inhibidor vasoactivo (PIV)	Efecto similar a la secretina sobre la glándula.	
Liberación de somatostatina	Inhibición de secreciones pancreáticas basales, incremento en la grasa fecal, disminución en la motilidad intestinal.	
Tripsina en duodeno	Inhibición de la liberación de CCK.	
Liberación de hormona tiroidea	Mantenimiento de la función pancreática normal y respuesta a estímulos.	
CCK, Colecistocinina.		

Tabla 29-3 Pruebas de función pancreática.

Prueba:	Prueba de estimulación con CCK o secretina
Preparación del paciente:	Secretina o CCK (o ambas) administrados IV
Muestra:	Aspirado duodenal
Hallazgo normal:	Líquido secretado en adecuada cantidad conteniendo bicarbonato, enzimas y proteínas
Prueba:	Grasa en materia fecal
Preparación del paciente:	80-100 g de grasa/día y carne por al menos



Muestra:	una semana
Hallazgo normal:	Heces (Recolección de 72 hrs) Menos de 7g de grasa excretada por día. No observar fibras de carne al microscopio
Prueba:	Excreción urinaria de amilasa
Preparación del paciente:	Recolección de orina e 24 hrs
Muestra:	Orina
Hallazgo normal:	Amilasa normal; muy elevada en receptores de trasplante pancreático
Prueba:	Enzimas pancreáticas en suero
Preparación del paciente:	Ninguna
Muestra:	Suero
Hallazgo normal:	TIR normal, tripsinógeno
Prueba:	Grasa o colesterol marcado con C^{13} o C^{14}
Preparación del paciente:	Grasas o colesterol marcado con C^{13} o C^{14} administrados por vía oral en una comida de prueba
Muestra:	Aliento
Hallazgo normal:	Excreción normal de $^{13}CO_2$ y $^{14}CO_2$
Prueba:	B-caroteno en suero
Preparación del paciente:	Control de B-caroteno en dieta
Muestra:	Suero
Hallazgo normal:	B-carotenos normales
<i>TIR</i> , tripsina inmunorreactiva <i>IV</i> , intravenosa	

Tabla 29-4. Eventos propuestos en el desarrollo de pancreatitis aguda.

Evento	Causas Probables
Daño a las membranas de células acinares	Reflujo de bilis o jugo pancreático hacia el páncreas, irritación del duodeno por alcohol o precipitación de tapones proteicos en la glándula, infección o inflamación en la vesícula biliar con extensión al páncreas, infección del páncreas por virus u otros microorganismos, isquemia, falla circulatoria, trauma, cirugía.
Cambios bioquímicos en la glándula	Activación de proenzimas como protripsina, proelastasa y pro-fosfolipasa A_2 a sus formas bioquímicamente activas, oclusión del conducto o conductillos pancreáticos; conversión de

	kalikreinógeno a kalikreína.
Edema, tumefacción de la cápsula pancreática	Inflamación glandular, alteración del flujo sanguíneo aferente o referente de la glándula.
Tetania y arritmias cardíacas, distrés respiratorio	Necrosis de la grasa peripancreática, secuestro de Ca^{++} por ácidos grasos, hipocalcemia refractaria, sustancias tóxicas desconocidas (fosfolipasa A_2 ?) que actúan sobre pulmón y otros órganos.
Necrosis hemorrágica de la glándula, choque, colapso circulatorio, choque pronunciada del volumen	Autólisis y digestión de la glándula con sangrado al espacio retroperitoneal, liberación de quininas plasmático hipotensoras, efecto citotóxico de la lisolecitina (de la bilis).
Muerte	Insuficiencia aguda respiratoria y circulatoria, hipotensión refractaria.

Tabla 29-5. Métodos para la determinación de amilasa.

Método	Principio	Uso	Comentarios
1. Turbidimétrico o Nefelométrico	La hidrólisis enzimática de una solución de almidón por la amilasa que causa en ambos métodos una disminución en la turbidez y en la cantidad de luz esparcida.	Raro	De interés histórico
2. Sacarogénico	La amilasa reacciona con un sustrato de polisacárido que causa la liberación de glucosa. La glucosa es cuantificada y directamente relacionada a la actividad de la amilasa	Frecuente	Fácilmente automatizado
3. Cromolítico	Un colorante o cromógeno unido al sustrato es liberado después de la reacción de la amilasa con el sustrato	Frecuente	Fácilmente automatizado



4. Polarización fluorescente	Un sustrato de almidón marcado con fluoresceína es degradado por la amilasa en pequeños fragmentos. Los fragmentos degradados giran más rápidamente que la molécula inicial y provocan una luz polarizada que es emitida como una fluorescencia despolarizada	Raro	Se requiere de equipo especializado

Tabla 29-6. Métodos para la determinación de lipasa

Método	Principio	Uso	Comentarios
Turbidimétrico o Nefelométrico	La acción de la lipasa sobre un sustrato en emulsión causa una disminución en el tamaño de las partículas. La disminución en la turbidez o en la luz esparcida es proporcional a la actividad enzimática	Frecuente	Estable, se requiere de un sustrato reproducible
Acoplamiento enzimático a. Producción de glicerol b. Determinación calorimétrica de glicerol	La lipasa hidroliza los triglicéridos del sustrato produciendo glicerol libre. El glicerol libre es cuantificado por varias técnicas.	Frecuente	El glicerol endógeno debe tomarse en cuenta

Figuras

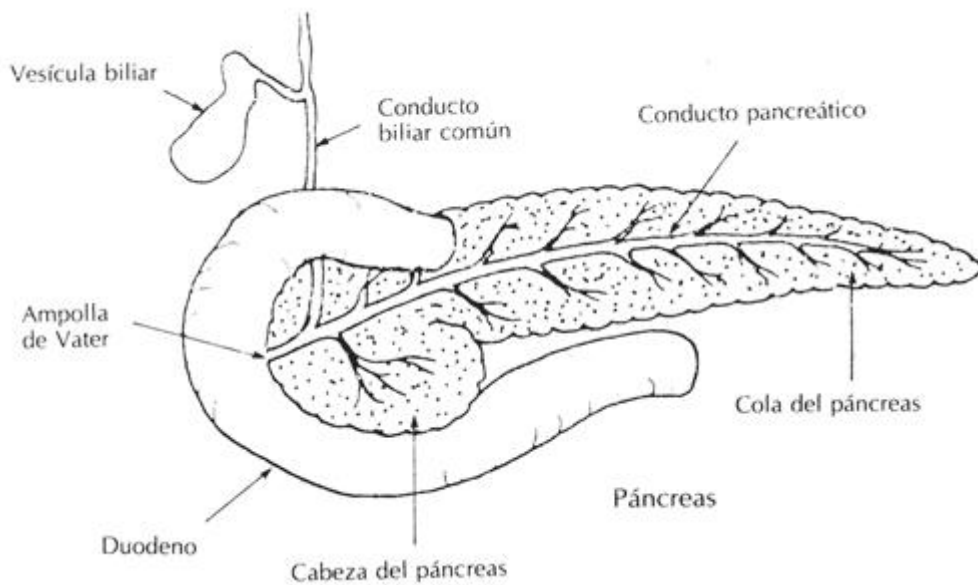


Figura 29-1 Estructura de páncreas y órganos circunvecinos. El conducto pancreático transporta la secreción pancreática exocrina al ámpula de Vater, en donde se vacía hacia el duodeno a través del esfínter de Oddi. Nótese que el esfínter está cerrado excepto durante los períodos de secreción. El conducto biliar común se une al conducto pancreático antes de que éste llegue al duodeno.

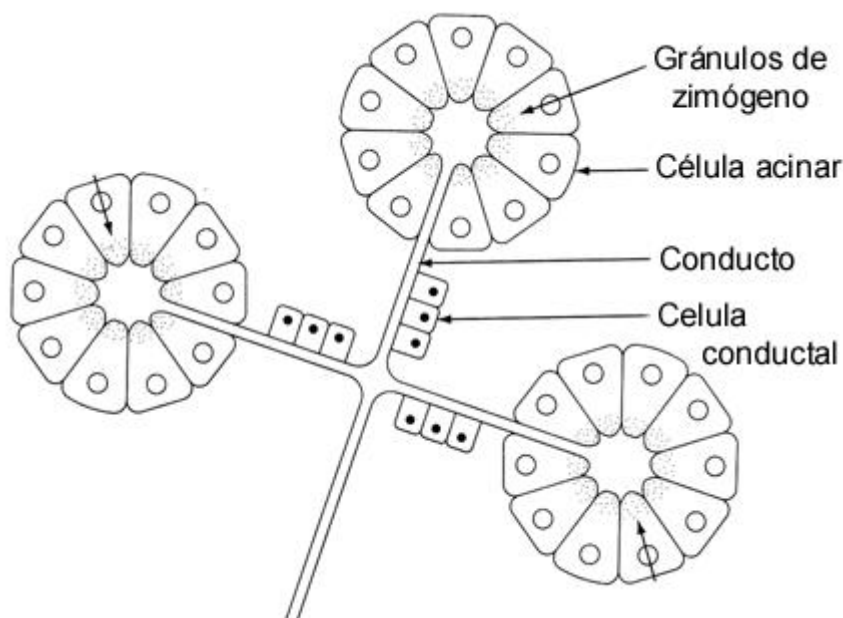


Figura 29-2 Esquema de las células acinares y conductillos asociados. Los acini exocrinos terminan con una colección de células acinares que contienen gránulos de zimógeno; estos últimos contienen proenzimas y otras enzimas digestivas descritas en la Fig 29-4. Las células especiales que delimitan los conductillos secretan agua y

electrolitos, en especial bicarbonato.

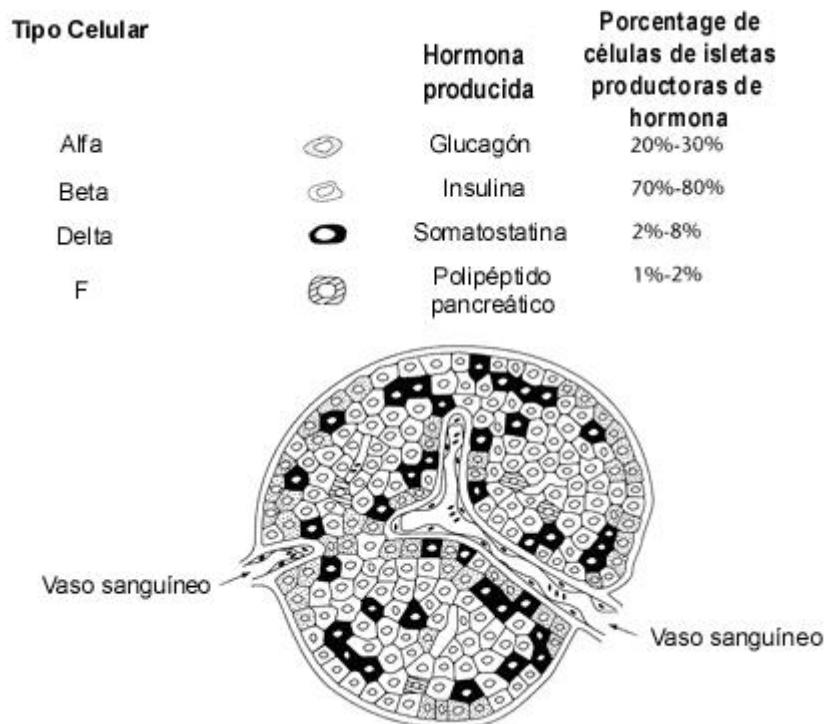


Figura 29-3 Esquema de un islote de Langerhans. Existen por lo menos cuatro tipos de células que secretan hormonas a la sangre. La mayoría de las células (células beta) producen insulina y solo una pequeña fracción de los islotes está compuesta de células F, los cuales son productoras del polipéptido pancreático (Adaptado de Unger RH, Orci L: *N Engl J Med*: 1518-1524, 1981).

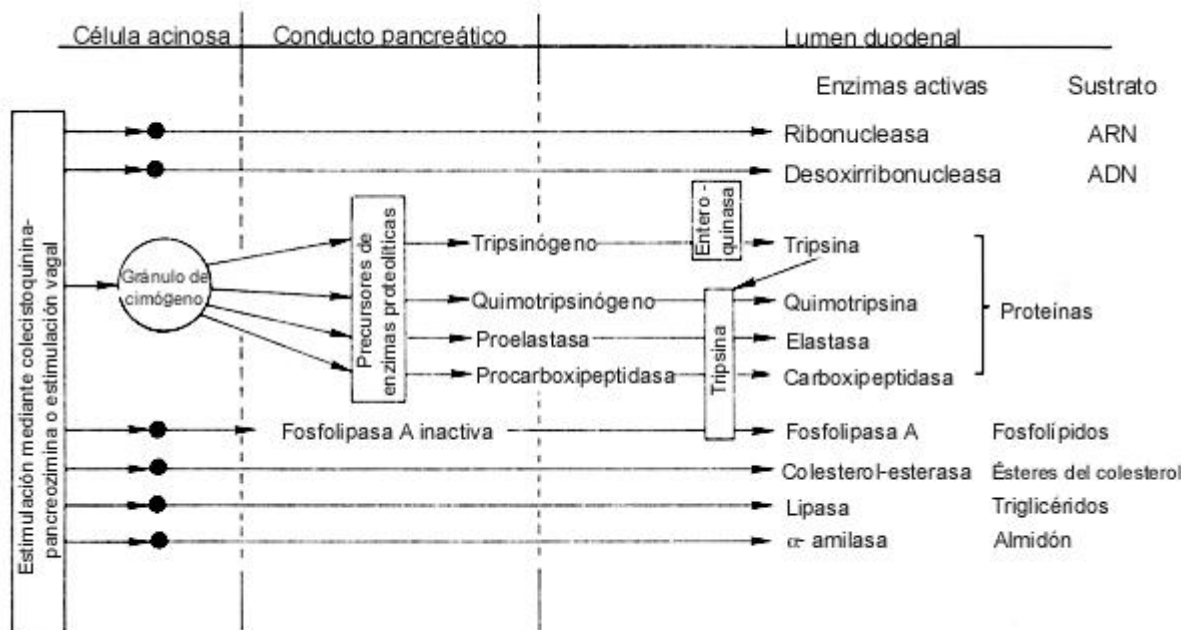


Figura 29-4 Las enzimas pancreáticas y su conversión a formas activas en el duodeno. Las enzimas son almacenadas en gránulos de zimógeno que llegan al conducto pancreático por exocitosis. Al llegar al duodeno, las pro-enzimas son convertidas en sus formas activas por la enteroquinasa y en menor grado por la tripsina.

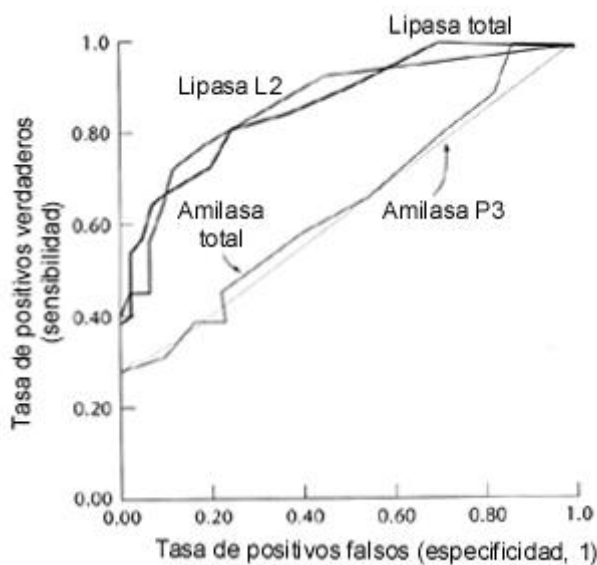


Figura 29-5 Curvas CRO (característica operador-receptor) para amilasa, P3-amilasa, lipasa, y L2-lipasa en el diagnóstico de pancreatitis. En el diagnóstico de pancreatitis las



pruebas de lipasa y L2-lipasa son significativamente mejores que amilasa y P3-amilasa. La prueba ideal debería mostrar una sensibilidad de 1 y una tasa de falsos-positivos de cero. Conforme se acerca la curva a la esquina superior izquierda de la gráfica, mejor es la prueba. (Adaptado de Zweig MH, Campbell G: *Clin Chem* 39:561-577, 1993).

CAPÍTULO 30

30. Función Gastrointestinal y Enfermedades Digestivas

Michael D.D. McNeely



Anatomía y funciones generales

Digestión

- Acción digestiva de la cavidad oral**
- Acción digestiva del estómago**
- Acción digestiva del duodeno**
- Digestión de carbohidratos**
- Digestión de proteínas**
- Digestión de grasas**

Absorción

- Absorción de carbohidratos**
- Absorción de proteínas**
- Absorción de grasas**
- Vitaminas D, E, A, y K**
- Absorción de agua y sodio**
- Calcio**
- Absorción de hierro**
- Formación de las heces**

Fisiología hormonal

- Estructura de las hormonas intestinales**
- Gastrina**
- Colecistoquinina**
- Secretina**
- Polipéptido intestinal vasoactivo**
- Polipéptido pancreático**
- Polipéptido inhibidor gástrico**
- Motilina**
- Péptidos inmunoreactivos como glucagón**
- Somatostatina**
- Péptidos encontrados en intestino y sistema nervioso (eje cerebro-intestino)**

Condiciones patológicas

- Malnutrición**
- Condiciones patológicas del estómago**
- Neoplasia endocrina múltiple**
- Síndromes de malabsorción**
- Síndrome carcinoide**
- Enfermedades del intestino grueso**
- Hiperalimentación**

Pruebas funcionales gastrointestinales

- Prueba de la acidez gástrica**
- Pruebas de estimulación gástrica**
- Prueba de Schilling**
- Pruebas de estimulación pancreática**



Pruebas de absorción de grasas
Prueba de absorción de la D-xilosa
Prueba de tolerancia a la lactosa

Alteraciones bioquímicas en estados patológicos

Gastrina
Otras hormonas gastrointestinales
Pruebas de mala absorción
Pruebas relacionadas con trastornos específicos

Métodos de análisis

Prueba de Schilling

OBJETIVOS

- ♦ Describir la anatomía del tracto digestivo normal. Resumir las funciones digestiva y de absorción del tracto digestivo normal.
- ♦ Enumerar las condiciones patológicas principales del tracto gastrointestinal y sus respectivas causas.
- ♦ Describir las pruebas de la función gastrointestinal y los resultados esperados en estados de enfermedad.
- ♦ Establecer los resultados esperados de las siguientes pruebas de laboratorio en los estados de enfermedad gastrointestinal: gastrina, caroteno, vitamina A, tripsina, grasa fecal, sangre oculta fecal, CEA, 5-HIAA y oxalato urinario.
- ♦ En términos generales, definir las hormonas gastrointestinales y describir su papel en la función gastrointestinal.
- ♦ Establecer el sitio de origen, la acción, y el significado clínico de las siguientes hormonas: gastrina, CCK-PZ, secretina, PIV, PP, PIG, motilina, enteroglucagón, y somatostatina.

Términos Clave

aclorhidria Literalmente “sin ácido clorhídrico”. Se refiere a la ausencia de producción de ácido por el estómago.

anticolinérgico Droga que se opone a la acción del sistema nervioso colinérgico.

células APUD Sigla para las propiedades citoquímicas de un grupo de células endocrinas que captan y descarboxilan precursores aminados.

e je cerebro-intestino Péptidos similares encontrados en el intestino, nervios, y sistema nervioso central.

enzimas pancreáticas exocrinas Enzimas requeridas para la digestión. A menudo liberadas en forma de precursores. Estas enzimas incluyen tripsinógeno, quimotripsinógeno, proelastasa, procarboxipeptidasa, ribonucleasa, desoxirribonucleasa, amilasa, lipasa, fosfolipasa A, y colesterol-estearasa.

gluten Proteína que se encuentra presente en el trigo y en los productos a base de

trigo.

hormonas gastrointestinales Sustancias producidas por células

gastrointestinales que luego se transportan a través de la circulación para ejercer su acción en un sitio determinado. Estas hormonas incluyen la colecistoquinina, secretina, glucagón, polipéptido inhibidor gástrico, polipéptido intestinal vasoactivo, bombesina, somatostatina, motilina, bulbogastrona, entero-oxitina y polipéptido pancreático.

hormonas pancreáticas Hormonas endocrinas relacionadas principalmente con el metabolismo intermedio de los hidratos de carbono que incluyen glucagón, insulina y gastrina.

intubación Procedimiento que consiste en la introducción de un tubo en el cuerpo, generalmente a través de una abertura anatómica, como la cavidad oral.

pirexia Fiebre. Temperatura corporal superior a 37.5° C.

quimo Producto final semisólido de la acción gástrica sobre los alimentos. El quimo consiste en mucus, secreciones gástricas, y alimentos degradados.

El tracto gastrointestinal es un tubo muscular recubierto por células epiteliales que abarca una longitud de 10 metros desde la boca hasta el ano. A lo largo de su trayectoria su estructura sufre modificaciones de acuerdo con los requerimientos particulares en lo que concierne a la digestión y la absorción de sustancias alimenticias. El concepto antiguo de tracto gastrointestinal la describe como un conducto inerte a través del cual pasan a la circulación las partículas de alimento. En la actualidad se sabe que la superficie intestinal de absorción representa un sistema orgánico extremadamente elaborado, recubierto de microvellosidades muy pequeñas que poseen complejos sistemas enzimáticos. Esta microestructura permite el desarrollo de mecanismos de absorción sumamente eficientes y muy selectivos.^{ref(879)} Además, el tracto gastrointestinal está regulado por un complejo sistema de control neurohormonal.^{ref(880)}

Como complemento de estos progresos en el conocimiento fisiológico, las nuevas técnicas diagnósticas, incluyendo los procedimientos de visualización, intubación fibroscópica y análisis químico, han dado origen a una nueva era en el campo del diagnóstico de enfermedades gastrointestinales.

ANATOMÍA Y FUNCIONES GENERALES

El tracto gastrointestinal posee cinco regiones diferentes: boca, estómago, duodeno, yeyuno-íleon e intestino grueso (Fig. 30-1).

La boca está compuesta por dientes, lengua, glándulas salivales y un complejo mecanismo de deglución. Esta porción del tracto digestivo es responsable de la degustación, desintegración y lubricación de los alimentos. El mecanismo de deglución propulsa los alimentos hacia el esófago, a través de la cavidad torácica, y hacia el interior del estómago.

El estómago está compuesto por una superficie rugosa y una estructura muscular recubierta por una capa mucosa protectora. La enérgica acción mezcladora del estómago es responsable de la homogeneización y desintegración de los alimentos. A ese nivel también se



secreta ácido hidróclórico y pepsina, los cuales continúan el proceso de desintegración. Estas acciones convierten al alimento en quimo.

El quimo ingresa en el duodeno en donde se secreta bilis y enzimas pancreáticas. En el duodeno comienza la degradación enzimática de las sustancias nutritivas básicas, y este proceso continúa a medida que el material avanza a lo largo del intestino delgado.

El intestino delgado posee una longitud de 4 metros. Su capacidad de absorción está incrementada por su subestructura microvellosa. El intestino delgado consta de dos porciones, el yeyuno, en situación proximal, y el íleon, en situación distal. A este nivel, los fragmentos de alimento son finalmente degradados y absorbidos hacia la corriente sanguínea.

Después de que las sustancias nutritivas se absorben, el material residual ingresa en el intestino grueso, en donde se produce un proceso de absorción hidroelectrolítica selectiva. El proceso digestivo finaliza con la formación de las heces.

La totalidad de la superficie de absorción del tracto gastrointestinal se drena por los vasos venosos portales. Estos vasos transportan el material recientemente absorbido hacia el hígado, en donde son metabolizados y convertidos en formas útiles. El tracto intestinal contiene células endocrinas, desde el estómago hasta el intestino delgado. Las hormonas gastrointestinales producidas por estas células son un grupo heterogéneo de péptidos activos biológicamente que están involucrados en la regulación de la función gastrointestinal. Además, un número importante de estos péptidos está presente en los nervios del tracto gastrointestinal^{ref(881)} y en el sistema nervioso central,^{ref(882)} estableciendo así el “eje cerebro-intestino” para estas hormonas. El conocimiento de que las hormonas intestinales están distribuidas no solamente en las células endocrinas sino también en nervios periféricos y centrales ha establecido el hecho de que estos péptidos funcionan no solamente como hormonas sino también como neurotransmisores.^{ref(883)}

Digestión

Es el proceso químico que consiste en transformar las sustancias nutritivas en formas absorbibles (asimilables) por el organismo. El proceso de digestión comienza en la cavidad oral y se completa generalmente en el segmento proximal del intestino delgado. En la Tabla 30-1 se resume el proceso digestivo de diversos alimentos.

Acción digestiva de la cavidad oral

El proceso de degustación de los alimentos en la boca se debe a la acción combinada de los receptores gustativos sobre la superficie dorsal de la lengua y los receptores gustativos sobre el paladar, faringe y amígdalas. Es posible reconocer cuatro sensaciones gustativas o gustos diferentes: dulce, salado, agrio y amargo. El sabor de los alimentos también depende de su olor. La integración de estos diversos estímulos nerviosos genera la sensación conocida como *gusto*. El sabor de una sustancia alimenticia es importante porque permite evitar la ingestión de alimentos desagradables, estimula el apetito e inicia un complejo reflejo psiconeurogénico que actúa sobre el resto del tracto gastrointestinal.

Parte de este reflejo estimula la producción de saliva desde los tres pares de glándulas salivales: parotídeas, mandibulares y sublinguales. Estas glándulas producen una secreción

viscosa de contenido hidromucoso que actúa como lubricante. También liberan la amilasa salivar que inicia la digestión del almidón.

Los alimentos son masticados mediante la compleja interacción de dientes, lengua y boca. El bolo alimenticio resultante es propulsado luego hacia el estómago.

Acción digestiva del estómago

El estómago es una bolsa muscular de pared delgada que puede dividirse groseramente en tres áreas. (Fig. 30-2). La parte superior del estómago es conocida con el nombre de *fondo*. La porción principal del estómago se denomina *cuerpo*. El canal de salida es denominado *antro* y está separado del duodeno por la región pilórica, la que está provista de un esfínter muscular potente.

La mucosa gástrica está recubierta por numerosos pliegues *rugosos*. Estos pliegues contribuyen al mezclado de los alimentos durante la acción homogeneizadora del estómago.

La mucosa gástrica contiene cuatro tipos de células. Las células mucosas se encuentran presentes en toda la extensión del estómago y secretan mucus que protege a la superficie de la acción del ácido y las enzimas. Las células del epitelio superficial revisten todo el estómago y también son capaces de secretar mucus; estas células proliferan rápidamente y por lo tanto proporcionan una superficie gástrica constantemente viable. Las células parietales producen ácido clorhídrico y factor intrínseco. Las células principales producen pepsinógeno. Estos dos últimos tipos celulares se encuentran presentes en toda la extensión del cuerpo del estómago.

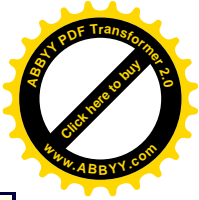
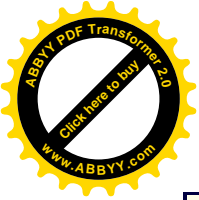
Las células del antro secretan principalmente mucus pero también una cierta cantidad de pepsinógeno. La hormona gastrina es sintetizada y almacenada en las células G del antro.

Existen tres fases de actividad gástrica. La primera es la fase de actividad cefálica, la cual se inicia por la vista y el olor de los alimentos. Estas sensaciones desencadenan un mensaje vagal directo desde el cerebro hacia el estómago, que inicia el proceso digestivo.

La siguiente es la fase gástrica de digestión, en la cual interaccionan diversos mecanismos para crear el medio digestivo adecuado (Fig. 30-3).

1. El nervio vago estimula directamente las células parietales provocando la liberación de ácido clorhídrico.
2. Las células del antro también son estimuladas por el vago para secretar gastrina. La gastrina a su vez estimula las células parietales para producir más ácido clorhídrico.
3. La distensión local del antro gástrico también estimula la producción de gastrina y por lo tanto la secreción de ácido clorhídrico.
4. Los reflejos colinérgicos (vaginales) se intensifican aun más por distensión del fondo gástrico.
5. Las células principales contienen receptores que responden al medio ácido iniciando la autoestimulación del precursor enzimático pepsinógeno. El pepsinógeno es rápidamente convertido en pepsina (forma activa) en presencia de a pH 3. También se liberan lipasa y otras enzimas, pero éstas ejercen una influencia mínima en el proceso digestivo.

La acción conjunta de las contracciones del antro, actividad del esfínter pilórico y



secreciones químicas transforman al bolo alimenticio en un material homogéneo, mucho más degradado y de contenido mucoso, conocido como *quimo*. La actividad gástrica disminuye a medida que transcurre el tiempo y el material desintegrado pasa entonces al duodeno.

Acción digestiva del duodeno

La etapa siguiente de la digestión tiene lugar en el duodeno. A medida que el quimo ingresa en este segmento intestinal, se produce la liberación de varias hormonas gastrointestinales a través de la estimulación nerviosa y local (Tabla 30-2). Estas hormonas ingresan en el sistema circulatorio portal y actúan principalmente sobre diversas regiones del tracto gastrointestinal. Para una revisión de la acción de estas hormonas ver más adelante y en la referencia [ref\(884\)](#)

Como resultado de esta intrincada actividad hormonal de retrocontrol (feedback), se secreta al duodeno sales biliares, bicarbonato, las enzimas amilasa y lipasa, y una variedad de enzimas proteolíticas. Consideraremos ahora la acción de estos agentes sobre las sustancias alimenticias primarias.

Digestión de carbohidratos[ref\(885\)](#)

Los carbohidratos se encuentran presentes en la dieta en forma de monosacáridos, disacáridos o polisacáridos complejos. Solamente los polisacáridos a nivel duodenal requieren una acción digestiva extensa a nivel duodenal. El almidón es el polisacárido complejo más común. Posee una estructura ramificada basada en uniones glucosídicas 1,4 ó 1,6. La amilasa es capaz de hidrolizar al almidón en oligosacáridos y en última instancia en disacáridos. El disacárido principal producido a partir del almidón es la maltosa. Por lo tanto, a medida que los alimentos abandonan el duodeno, los monosacáridos y los disacáridos provenientes de la dieta, y los disacáridos resultantes de la digestión por acción de la amilasa, pasan al yeyuno y al íleon en donde son absorbidos.

Digestión de proteínas[ref\(886\)](#)

Las proteínas de la dieta son parcialmente degradadas en el estómago por el ácido clorhídrico y la pepsina. En el duodeno, la tripsina, quimotripsina y la pepsina. En el duodeno, la tripsina, quimotripsina y carboxipeptidasa secretadas por el páncreas actúan sobre las proteínas parcialmente degradadas para formar polipéptidos, dipéptidos y aminoácidos. Estas pequeñas moléculas pasan luego al yeyuno y al íleon para ser absorbidas.

Digestión de las grasas[ref\(887\)](#)

La digestión de las grasas es más compleja que la digestión de otras sustancias alimenticias básicas. La mayor parte de las grasas de la dieta están representadas por triglicéridos de cadena larga (ácidos palmítico, esteárico, oleico y linoléico). El estómago reduce el tamaño de las partículas de las sustancias grasas mediante su acción mezcladora. En el duodeno, las grasas son emulsionadas por la acción detergente de la bilis. La emulsión permite que la lipasa pancreática actúe sobre los lípidos que de otro modo serían insolubles en agua. La lipasa provoca una hidrólisis que da origen inicialmente a un diglicérido, luego a un



monoglicérido y finalmente a un ácido graso y glicerol (véase Capítulo 33).

Las sales biliares, tan importantes en la digestión de las grasas, son sintetizadas en el hígado a partir de colesterol y conjugadas para formar taurina o glicina. Las sales biliares principales son conjugados de ácido cólico y quenodesoxicólico.

Absorción

Es el proceso por el cual las sustancias alimenticias digeridas ingresan en el organismo.^{ref(888)} Una vez que atraviesan el duodeno, las sustancias digeridas llegan al yeyuno y al íleon en donde tiene lugar el proceso final de absorción.

La mucosa intestinal está provista de numerosos pliegues, los cuales contribuyen a la propulsión distal del contenido intestinal. La superficie de cada pliegue está formada por proyecciones digitales conocidas con el nombre de *vellosidades* (Fig. 30-4). Cada vellosidad incrementa muchas veces la superficie de absorción. Los estudios mediante microscopia electrónica han demostrado que cada vellosidad se encuentra cubierta por proyecciones capilares denominadas *microvellosidades*. Existen 200 millones de microvellosidades por centímetro de epitelio. Por lo tanto, el intestino está provisto de una superficie de absorción masiva de unos 500 m².

Antiguamente se pensaba que el intestino delgado secretaba enzimas para producir un jugo digestivo conocido como jugo intestinal *succus entericus*. Actualmente se sabe que la acción enzimática principal tiene lugar en la superficie epitelial. Con el conocimiento de la presencia de mecanismos intestinales altamente selectivos destinados a la absorción de cada sustancia nutritiva el concepto del intestino como filtro puramente pasivo, a través del cual las sustancias alimenticias pasaban a la circulación, ha sido completamente abandonado.

Aunque existen diferencias locales en cuanto a la capacidad intestinal de absorción de diferentes sustancias alimenticias, estas diferencias no serán consideradas en detalle en esta sección.

Absorción de carbohidratos

Los procesos digestivos provocan la degradación de los carbohidratos en monosacáridos y disacáridos. Los monosacáridos; glucosa, galactosa, y fructosa; son absorbidos mediante mecanismos específicos de transporte activo; es decir, estas sustancias son absorbidas desde la luz intestinal hacia la sangre en contra de un gradiente de concentración. Para que esto sea posible se requiere la producción de energía.

Los disacáridos son degradados a monosacáridos por la actividad enzimática de las disacaridasas situadas en las microvellosidades. Por ejemplo, el azúcar de la leche, lactosa, es degradado por la enzima lactasa en sus azúcares constituyentes, glucosa y galactosa. Luego, estos azúcares son absorbidos activamente. El disacárido sacarosa es degradado por la enzima sacarasa para dar origen a glucosa y fructosa. La maltosa, que representa el producto común de la hidrólisis del almidón, es degradada por la maltasa de superficie en dos moléculas de glucosa.



Absorción de proteínas

Los productos de digestión de las proteínas consisten en polipéptidos pequeños, dipéptidos y aminoácidos. Los dipéptidos son más rápidamente absorbidos que los aminoácidos debido a la presencia de mecanismos especiales de transporte. Las proteínas no son absorbidas directamente. En la superficie mucosa se localiza un gran número de mecanismos específicos de absorción para diversos tipos de aminoácidos.

Absorción de grasas (Ver también Capítulo 33)

Las grasas digeridas ingresan en el intestino en forma de micelas. Los ácidos grasos y los monoglicéridos entran a las células epiteliales intestinales por difusión, y luego interaccionan con una proteína fijadora. Los ácidos grasos de cadena larga de 16 a 18 carbonos son reesterificados para formar triglicéridos y luego se fijan a apolipoproteínas para dar origen a los quilomicrones. Estas pequeñas gotitas grasas son liberadas en el sistema linfático y transportadas por el conducto torácico antes de ingresar a la circulación sanguínea. Los ácidos grasos de cadena mediana (8 a 10 carbonos) no son reesterificados e ingresan rápidamente en la circulación portal fijados a la albúmina.

Vitaminas D, E, A y K^{ref(889)}

Estas vitaminas, (Ver también capítulo 39), no son hidrosolubles y por lo tanto deben ser absorbidas como lípidos. En consecuencia, la absorción de estas vitaminas depende de una absorción lipídica normal. La absorción de la vitamina D es modificada por la ingestión y el metabolismo del calcio.

Absorción de agua y sodio

El control de la absorción de agua no es del todo conocido, pero se cree que la modalidad intestinal consiste en este caso en el flujo de agua secundario a la absorción de sodio. El sodio es absorbido por un mecanismo de transporte activo ligado a la absorción de aminoácidos, bicarbonato y glucosa.

Calcio

El transporte del calcio (Ver también capítulo 28), está relacionado con la vitamina D y la hormona paratiroidea y es regulado por una proteína fijadora de calcio a nivel de las células de la mucosa.^{ref(890)}

Absorción del hierro (Ver también capítulo 35)

Se requiere la presencia de ácido gástrico para convertir el hierro en la forma ferrosa absorbible.^{ref(891)} Posteriormente, el hierro ingresa en las células mucosas y es transportado a través de dichas células antes de unirse a proteínas acarreadoras que lo transportan en la circulación sanguínea.

Formación de las heces



Una vez atravesado el íleon y el yeyuno, el contenido intestinal ingresa en el intestino grueso. En este segmento intestinal, la absorción de sustancias nutritivas es muy escasa. A este nivel se produce una absorción activa de agua que retorna a la circulación. Además, este segmento intestinal es responsable de la regulación del equilibrio electrolítico. La formación de las heces es producida por la deshidratación progresiva de sustancias alimenticias no digeridas, juntamente con la acción de las bacterias que habitan en el colon.

Fisiología Hormonal

Estructura de hormonas intestinales

Las dos familias principales de hormonas intestinales son la gastrina y la secretina. La familia *gastrina* consiste principalmente en gastrina y colecistoquinina, pero además, la motilina y la encefalina comparten muchas propiedades estructurales. El grupo *secretina* incluye secretina, polipéptido inhibidor gástrico (PIG), polipéptido intestinal vasoactivo (PIV), glucagón y bombesina.^{ref(892)} Muchas de estas hormonas están presentes en múltiples formas de diferente peso molecular.

Las hormonas intestinales se consideran como reguladores de la digestión y absorción. Se liberan en respuesta a la presencia de nutrientes en el lumen del tracto gastrointestinal y estimulan la liberación de ácido, bicarbonato, y enzimas para la digestión de la comida. Una vez que los nutrientes entran a la sangre, se liberan las hormonas metabólicas pancreáticas. Este nexo conduce al término *eje enteroinsular*. Diferentes pasos de digestión, absorción, y almacenamiento pueden ser estimulados e inhibidos por diferentes péptidos gastroenteropancreáticos.

Cada función gastrointestinal tiene muchos agonistas y antagonistas. El control final depende de esta forma de un balance fino de numerosas influencias. En el caso de la secreción ácido gástrica, por lo menos hay 21 factores diferentes que tienen importancia en su control normal. Motilina, gastrina, PIV, y glucagón son las hormonas más importantes relacionadas con el control de la secreción, absorción, motilidad, y crecimiento en el estómago e intestino. La secretina, colecistoquinina (CCK), PIV, y polipéptido pancreático (PP) controlan la función pancreática exocrina, mientras que la insulina y el PIG están relacionados al eje enteroinsular. La insulina, glucagón, y somatostatina están primariamente relacionadas con el metabolismo de carbohidratos, grasas, y proteínas. La sustancia P, PIV, y las encefalinas ejercen importantes funciones como neurotransmisores en los sistemas nerviosos central, periférico, y autónomo.

Gastrina^{ref(893)}

La gastrina existe en múltiples formas moleculares, conteniendo desde 14 a 34 aminoácidos. El origen celular de la gastrina es las células G del intestino. Estas células se extienden sobre el lumen del intestino, donde terminan en un ovillo formado por microvellosidades.

La gastrina estimula la secreción de ácido, la motilidad gástrica, y el crecimiento de la mucosa fúndica y la mucosa del intestino delgado.^{ref(894)} La secreción de gastrina está mediada por estímulo luminal, nervioso, y sanguíneo. Los principales estímulos luminales son los aminoácidos producidos por la digestión de proteínas.^{ref(895)} Otros estímulos luminales incluyen



el calcio, alcohol, y el pH intragástrico. El exceso de ácido provee un mecanismo de retroalimentación para la autorregulación de la liberación de gastrina. Son conocidos como inhibidores de la liberación de gastrina la secretina, PIG, PIV, glucagón, calcitonina, y somatostatina.

Colecistoquinina

La molécula es un péptico básico de 33 residuos de aminoácidos. La colecistoquinina (CCK) se encuentra en el cerebro y en las células K de la mucosa del intestino delgado superior.

El hallazgo de péptidos similares a la CCK en el sistema nervioso central y en el intestino indica que estos péptidos pueden funcionar tanto como neurotransmisores u hormonas. El papel fisiológico de la CCK es la regulación de la motilidad de la vesícula e intestino y la regulación de la secreción por el páncreas. Las acciones fisiológicas de la CCK en el páncreas incluyen la estimulación de la liberación de enzimas, la potenciación de la acción de la secretina, y la estimulación del crecimiento del páncreas. Una mezcla de polipéptidos y aminoácidos es un estímulo fuerte para la liberación de CCK. Los ácidos grasos con cadena mayor de nueve carbonos también estimulan la liberación de CCK.

Secretina

La secretina es un polipéptido básico de 27 residuos de aminoácidos con mucha similitud a la secuencia encontrada en el glucagón. La secretina se localiza predominantemente en las células S de la mucosa del duodeno y yeyuno.^{ref(896)}

La secretina inhibe la contracción del músculo liso, disminuye la secreción ácida gástrica, disminuye la presión del esfínter esofágico inferior, y estimula el crecimiento pancreático. Además de estos efectos, estimula la secreción de agua y bicarbonato desde el páncreas y la secreción de las glándulas de Brunner y aumenta la contracción de la vesícula. Tiene una acción sinérgica junto con la CCK sobre la estimulación de la contracción vesicular y la secreción enzimática del páncreas.^{ref(897)} El papel fisiológico primario de la secretina parece ser la modulación de la secreción pancreática de bicarbonato.

Un estímulo principal para la liberación de secretina duodenal es el ácido estomacal, pero en el yeyuno adulto raramente hay la cantidad suficiente de ácido para liberar secretina.^{ref(898)} Los ácidos grasos con cadena de 10 o más carbonos estimulan débilmente la liberación de secretina.

Polipéptido intestinal vasoactivo

El polipéptido intestinal vasoactivo (PIV) tiene 28 aminoácidos y está presente en células endocrinas y nervios del intestino y del sistema nervioso central.^{ref(899)} El PIV tiene un amplio espectro de actividades gastrointestinales, incluyendo inhibición de la secreción ácida gástrica, estimulación de la liberación de insulina, estimulación de la secreción pancreática de agua y bicarbonato, y estimulación de la secreción hidroeléctrolítica intestinal.

Polipéptido pancreático

El polipéptido pancreático (PP) tiene 36 aminoácidos, pero la totalidad de su actividad



biológica es desarrollada por los últimos 6 aminoácidos. El PP se encuentra casi enteramente en el páncreas, donde se distribuye en las células D₂ de los islotes. Estudios farmacológicos muestran que el PP se opone a los efectos de la colecistoquinina.^{ref(900)} Inhibe la secreción de enzimas pancreáticas y la contracción vesicular. A dosis algo mayores tiene un efecto bifásico, inicialmente estimulando y después inhibiendo la producción de bicarbonato pancreático. El PP puede jugar un papel en la modulación de la secreción de insulina y glucagón por los islotes. La grasa y proteínas parecen ser el principal constituyente dietario responsable de la liberación de PP después de una comida.

Polipéptido inhibidor gástrico

El polipéptido inhibidor gástrico (PIG) tiene 43 aminoácidos y se encuentra en las células K de la mucosa del yeyuno y, en menor grado, del duodeno e

Hay un aumento en el PIG después de una comida relativamente prolongada.^{ref(901)} Con la ingestión oral de alimento, el PIG ocasiona un aumento de la liberación de insulina inducida por la glucosa. El PIG también es un potente estimulador de la secreción hidroelectrolítica por el intestino delgado.

Motilina

La motilina es un péptido con 22 aminoácidos encontrado en las células enterocromafines del intestino delgado, predominantemente en la porción proximal.

La motilina es liberada en el plasma después de una comida, en especial si el contenido graso es alto. En el hombre la acidificación duodenal ocasiona un incremento en la motilina plasmática. Las acciones de la motilina incluyen estimulación del intestino delgado y la motilidad gástrica, aumento en la presión a nivel del esfínter esofágico inferior, y estimulación de la producción de pepsina. La motilina acelera el vaciamiento gástrico en el hombre, y también puede ser responsable del vaciamiento del intestino delgado entre comidas.

Péptidos inmunoreactivos como glucagón

Se han identificado muchas formas moleculares de esta familia de hormonas, la cual incluye el glucagón pancreático. Cada péptido intestinal probablemente tiene un papel fisiológico diferente, aunque en el intestino sólo es posible hallar un tipo celular con inmunorreactividad similar a la del glucagón.^{ref(902)}

El glucagón y los péptidos inmunorreactivos como glucagón tienen muchas acciones biológicas, como relajación del músculo liso, inhibición de la secreción de enzimas pancreáticas, inhibición de la secreción ácida gástrica, estimulación de la secreción hidroelectrolítica intestinal y, estimulación del rendimiento cardíaco. El glucagón pancreático es secretado principalmente en respuesta a una hipoglicemia y es importante en la movilización del almacenamiento de glucógeno hepático y en la homeostasis de carbohidratos (ver capítulos 27 y 32).

Somatostatina

La somatostatina es un péptido compuesto de 14 aminoácidos. Se encuentra en todo el cerebro, pero la mayor concentración se halla en el hipotálamo. En el intestino, la mayor cantidad de somatostatina se encuentra en el antro gástrico, en la mucosa del intestino delgado superior, en las células de los islotes de Langerhans del páncreas, y en un pequeño número de

1200



finas fibras nerviosas.[ref\(903\)](#)

En el tracto gastrointestinal, la somatostatina inhibe el vaciamiento gástrico, la secreción de pepsina, la contracción vesicular, y la secreción de bilis y enzimas pancreáticas.[ref\(904\)](#) La somatostatina es también uno de los más potentes inhibidores conocidos de las secreciones endocrinas.[ref\(905\)](#) Inhibe completamente la liberación de la hormona de crecimiento y también inhibe la liberación de la hormona estimulante del tiroides, insulina, glucagón, polipéptido pancreático, gastrina, secretina, motilina, enteroglucagón, y neurotensina.[ref\(906\)](#) Además, la somatostatina puede prevenir la secreción ácida durante la infusión de pentagastrina y la secreción de bicarbonato pancreático durante la infusión de secretina.[ref\(907\)](#)

Péptidos encontrados en el intestino y sistema nervioso (eje cerebro-intestino)

Muchos de estos péptidos han sido discutidos previamente; la lista incluye gastrina, colecistoquinina, PIV, motilina, somatostatina, neurotensina, bombesina, sustancia P, y encefalina. Otros péptidos en este grupo son la neurotensina, sustancia P, y el grupo de opiáceos endógenos, incluyendo las encefalinas y las endorfinas.

Condiciones Patológicas

Malnutrición (Ver también capítulo 37)

La malnutrición es provocada por una ingestión anormal de alimentos. Este trastorno es una de las principales causas de muerte en todo el mundo. En Norteamérica el estado de malnutrición más frecuente es la sobrenutrición. La obesidad contribuye en el índice de mortalidad de todas las enfermedades pero se encuentra íntimamente relacionada con la diabetes, hipertensión, enfermedad cardiovascular y trastornos emocionales. La subnutrición puede ser debida a la carencia de alimentos, dietas anómalas, malabsorción y estados hipermetabólicos. Hay un reconocimiento creciente del estado de malnutrición de la población de edad avanzada en los Estados Unidos. Los alcohólicos, drogadictos o pacientes con alteraciones mentales pueden padecer diversas formas de subnutrición. Los individuos crónicamente enfermos pueden sufrir de anorexia o pérdida del apetito. Ocasionalmente, ciertas personas adoptan dietas anómalas que carecen de los requerimientos nutritivos básicos. Las enfermedades del tracto gastrointestinal pueden impedir la absorción de sustancias nutritivas. Los procesos malignos, la pirexia y las anormalidades endocrinas pueden consumir la energía de los alimentos a mayor velocidad que la que lleva a la asimilación.[ref\(908\)](#)

Condiciones patológicas gástricas

Úlceras.

La etiología de las enfermedades ulcerosas[ref\(909\)](#) es múltiple y se relaciona con factores genéticos y psicológicos. Por ejemplo, existe un aumento de incidencia de enfermedad ulcerosa en personas con grupos sanguíneos O. Algunos investigadores han postulado que existe un incremento del pepsinógeno sérico en asociación con un riesgo aumentado de úlcera duodenal.[ref\(910\)](#) Se ha registrado una disminución de la incidencia de la enfermedad ulcerosa en los últimos 20 años, pero actualmente esta afección se observa en pacientes de mayor edad. La úlcera gástrica y la úlcera duodenal corresponden a trastornos diferentes.

La patogenia de la úlcera duodenal ha sido extensamente estudiada.[ref\(911\)](#) Los pacientes con úlcera duodenal, como grupo, poseen una capacidad aumentada de secreción de ácido y



pepsina. Estos pacientes exhiben una respuesta aumentada a la gastrina y un incremento del ácido gástrico y por lo tanto envían una carga ácida aumentada al duodeno.

Otros factores han sido implicados en la patogenia de las úlceras duodenales, incluyendo las prostaglandinas de la mucosa, el revestimiento de la mucosa y la presencia de la bacteria *Helicobacter pylori*. Se considera ahora al *H. Pylori* como la causa directa de muchos casos de gastritis activa crónica, y hay claras evidencias que la relacionan a la úlcera péptica, cáncer gástrico, y linfoma gástrico primario.^{ref(912)} Seguramente, la erradicación del *H. Pylori* está asociada con la reducción de los síntomas de las úlceras.^{ref(913)}

La fisiopatología de la ulceración gástrica no ha sido definitivamente determinada. Los pacientes con úlcera gástrica tienen elevadas las concentraciones séricas de gastrina en estado basal y postprandial. Estos pacientes tienen una menor producción de ácido basal y máxima, que lo normal, y parece probable que la mayor cantidad de gastrina sérica es el resultado de una inhibición disminuida. Lo que parece estar claro es que las úlceras gástricas no están asociadas con una acidez aumentada. El diagnóstico de úlcera generalmente se basa en elementos clínicos, con importancia fundamental de las técnicas radiológicas y endoscópicas. La respuesta al tratamiento también es de gran importancia diagnóstica. El tratamiento generalmente consiste en la administración de antiácidos o de agentes anticolinérgicos como la cimetidina. La cirugía, que habitualmente consiste en una vagotomía y drenaje antral, se considera una modalidad secundaria de tratamiento y se emplea en los casos de úlceras recurrentes.

Después de una cirugía gástrica, poco tiempo después de la ingestión de alimentos es posible observar la aparición de diversas complicaciones de base fisiológica. Algunas personas sometidas a una intervención gástrica absorben glucosa a una velocidad anormalmente alta. Este fenómeno desencadena una rápida liberación de insulina, la cual puede producir una hipoglucemia.

Otro inconveniente se debe a la entrada rápida en el intestino de partículas alimentarias osmóticamente activas. Esto provoca un movimiento hidroelectrolítico hacia la luz intestinal. La hipovolemia y la hipokalemia transitoria pueden provocar náuseas y mareos. La activación del sistema caliceína-quinina ejerce una acción importante aunque no totalmente esclarecida en este síndrome del dumping.

Obstrucción pilórica.

En la obstrucción pilórica, el canal gástrico de salida es obstruido por la contracción de una úlcera, un proceso maligno o una anomalía congénita. La obstrucción se caracteriza por vómitos (a menudo en proyectil), distensión abdominal y pérdida de ácido clorhídrico, lo que conduce a una alcalosis metabólica hipoclorémica.

Cáncer.

La incidencia de cáncer de estómago^{ref(914)} está disminuyendo en Norteamérica pero sigue elevada en Rusia y en Japón (54% de todos los tumores malignos). Aparece con mayor frecuencia en la séptima y octava década de la vida y la sobrevivida a los 5 años permanece en el orden del 15%. Más de la mitad de los cánceres gástricos se observan en el píloro o en el antro. El tratamiento de esta lesión consiste en cirugía combinada con radioterapia o quimioterapia. Las infecciones del estómago con *Helicobacter pylori* están asociadas con un aumento aproximadamente de seis veces en la incidencia de cáncer gástrico.^{ref(915)}

Síndrome de Zollinger-Ellison.

Es una forma extrema de enfermedad ulcerosa péptica causada por un tumor pancreático secretor de gastrina (gastrinoma).^{ref(916)} La continua liberación de gastrina estimula una hipersecreción de ácido clorhídrico a nivel gástrico.^{ref(917)} La presentación clínica típica (no observada en todos los pacientes) consiste en la ulceración péptica recurrente. Un 75% de pacientes con este síndrome presentan úlceras en el bulbo duodenal o en el área postbulbar inmediata. Estos tumores a menudo son muy pequeños y pueden ser difíciles de identificar. Un 60% de los tumores metastatizan y es frecuente observar la presencia de tumores múltiples. Algunos tumores (un 10 %) se originan en la pared duodenal. La secreción excesiva de ácido clorhídrico es responsable de la mayor parte de las manifestaciones clínicas de este síndrome. La gran cantidad de ácido gástrico que ingresa en el duodeno interfiere con la digestión de grasas y conduce a una esteatorrea. La prolongada secreción de gastrina provoca una hieltrófia del estómago, con una hiperplasia de las células parietales. La secreción de bicarbonato pancreático está aumentada como compensación de la carga ácida enviada al duodeno. A menudo existen ulceraciones intestinales. El revestimiento del intestino proximal frecuentemente muestra vellosidades anormales, edema submucoso y hemorragia. Dado que la gastrina también inhibe la absorción de agua y sal a nivel intestinal, se observará una diarrea en un 50% de los pacientes. La diarrea se ve agravada por el hecho de que el intestino recibe un gran volumen de contenido gástrico. El síndrome de Zollinger-Ellison está asociado con hiperparatiroidismo en un 20% de los pacientes. Otras anormalidades endocrinas menos frecuentes asociadas con este síndrome incluyen tumores hipofisarios, adrenales, ováricos y tiroideos. Este grupo de adenomas y carcinomas endocrinos se denomina *síndrome de neoplasia endocrina múltiple (NEM) I*. Puede ser heredado en forma autosómica dominante como lo describió originalmente Werner o puede aparecer espontáneamente (ver también más adelante).^{ref(918)}

La presencia de una concentración de gastrina, en ayunas, cuatro veces mayor que el límite normal superior, en ausencia de aclorhidria o de insuficiencia renal, sugiere firmemente la existencia de un síndrome de Zollinger-Ellison. Este criterio no se cumple en un 40% de casos.

Se ha empleado la prueba de estimulación. La gastrina sérica se determina tras la administración de: 1) secretina intravenosa, 1 a 2 unidades/kg de peso; 2) gluconato de calcio intravenoso, o 3) una comida estándar. La prueba de la secretina, con un incremento postinyección de gastrina en el orden de los 110 pg/mL, es la prueba más fiable.^{refs(919)} En un 5% de pacientes es posible observar una respuesta negativa a la secretina. Por lo tanto, la sensibilidad de esta prueba es de un 95% y su especificidad es de prácticamente un 100%.

En resumen, para el diagnóstico del síndrome de Zollinger-Ellison, primero, los pacientes apropiados son evaluados con determinaciones de gastrina sérica en ayunas. Luego se realiza la prueba de secretina a aquellos pacientes con valores de gastrina sérica en ayunas superiores a 100 pg/mL.

Anemia perniciosa.

Es una enfermedad que consiste en una aclorhidria, atrofia gástrica e incapacidad para secretar el factor intrínseco. La deficiencia de factor intrínseco impide la absorción de vitamina B₁₂. Esto conduce a la aparición de insuficiencia del epitelio mucoso, degeneración



de los cordones posteriores de la médula espinal y a la aparición de una anemia macrocítica. Este cuadro se expone en detalle en el Capítulo 39.

Neoplasia endocrina múltiple

La neoplasia endocrina múltiple describe un grupo de síndromes, frecuentemente familiares, en que dos o más glándulas endocrinas experimentan hiperplasia o formación de tumor en la misma persona, al mismo tiempo o consecutivamente. Las glándulas hiperfuncionantes secretan sus hormonas normales principales (síndromes ortoendocrino) y hormonas anormales (síndrome paraendocrino). Hay dos tipos principales de síndromes neoplásicos endocrinos múltiples.

Neoplasia endocrina múltiple tipo I (NEM I, o AEM I), o síndrome de Werner.

Este síndrome se manifiesta a partir de la segunda década de vida hasta la edad avanzada con una distribución igual en ambos sexos. Los órganos afectados en orden de frecuencia son paratiroides (88%), islotes pancreáticos (81%), hipófisis anterior (65%), corteza adrenal (38%), y células foliculares de la tiroides (19%).

Las alteraciones de la tiroides varían, y ocasionalmente es posible detectar la presencia de tumores carcinoides en los pulmones, páncreas, o intestino. La ulceración péptica, especialmente duodenal, es una característica común en algunas familias y puede afectar a más de la mitad de los pacientes. Esto quizás forma parte del síndrome de Zollinger-Ellison como resultado de un gastrinoma pancreático asociado o hiperparatiroidismo. Muchas de estas lesiones son APUDomas, y el síndrome puede ser el resultado de una displasia generalizada de las células APUD.

Neoplasia endocrina múltiple tipo II (NEM II, o AEM II), o síndrome de Sipple.

El síndrome de neoplasia múltiple tipo II es comúnmente heredado, afecta a ambos sexos por igual, y puede manifestarse por sí mismo a partir de la primera década hacia adelante, más común entre los 20 y los 40 años. Se reconocen tres formas del síndrome. El tumor más común es el carcinoma medular de la tiroides con un feocromocitoma en una o ambas glándulas. Puede estar presente el hiperparatiroidismo resultado de hiperplasia o adenoma y es probablemente causado por la hipercalcemia. Otra variante es un carcinoma medular de la tiroides y feocromocitoma con pequeños neuromas subcutáneos y submucosos múltiples de los párpados, lengua, y mucosa bucal con una difusa hipertrofia de los labios. Estas lesiones están presentes desde el nacimiento. En el último tipo de síndrome se encuentran presentes todas las manifestaciones posibles con una ganglioneuromatosis autónoma y otras anomalías congénitas.

Síndromes de malabsorción

En los síndromes de malabsorción, el tracto gastrointestinal se encuentra alterado y no puede absorber diversos materiales nutritivos. Estos cuadros generalmente son la consecuencia de un trastorno que provoca lesiones del revestimiento mucoso. Los pacientes en los que se sospecha la existencia de un síndrome de malabsorción generalizada deben ser evaluados mediante la determinación de hierro sérico, vitamina B₁₂, albúmina y calcio.

Además, las determinaciones de inmunoglobulinas pueden ser de utilidad para descartar una deficiencia de IgA, condición que permite el desarrollo de infecciones parasitarias. Es posible

emplear la prueba de absorción de la D-xilosa como un procedimiento de evaluación de pacientes en los que se sospecha de una malabsorción generalizada.

La otra categoría de síndrome de malabsorción debe considerarse en realidad como una *mala digestión*. En este grupo de trastornos se encuentra alterado de alguna manera uno de los factores determinantes del proceso de digestión. Este síndrome es provocado más frecuentemente por alguna forma de insuficiencia pancreática (ver Capítulo 29) o por una intervención quirúrgica. El síndrome de mala digestión más común conduce a una malabsorción y a una esteatorrea.

Esteatorrea.

Es un síndrome clínico caracterizado por una malabsorción de las grasas de la dieta. La grasa no digerida llega al intestino grueso y las heces contienen una cantidad anormal de lípidos y son típicamente pálidas, voluminosas y grasosas con olor fétido. Es importante la distinción clínica entre las heces eliminadas en la esteatorrea y las heces eliminadas en la diarrea. Cuando se sospecha la existencia de una esteatorrea debe determinarse cuantitativamente la cantidad de grasa presente en las heces. Cuando se ha demostrado que existe un exceso de grasas, se investigará la causa específica de este trastorno. La esteatorrea puede deberse a una deficiencia de cualquier factor importante para la digestión de los lípidos o para la absorción de las grasas, condiciones que producen esteatorrea incluyen el síndrome de Zollinger- Ellison, el incremento de ácido duodenal (síndrome postgastrectomía), una excreción biliar anormal, insuficiencia pancreática, trastornos de la mucosa intestinal y una enfermedad el intestino grueso que provoque una interrupción de la circulación enterohepática.

Enfermedad celíaca.

Constituye una causa sumamente importante de malabsorción. En este caso, los pacientes parecen responder anormalmente desde un punto de vista inmunológico a la presencia de gluten en la dieta. Hasta un 90% de los pacientes con enfermedad celíaca muestran la existencia de anticuerpos circulantes contra el gluten. La respuesta al gluten consiste en la exfoliación de la superficie mucosa microvellosa del intestino. Este trastorno reduce en forma drástica el área de superficie de absorción y provoca un cuadro de malabsorción. La enfermedad celíaca puede manifestarse en muchas formas sutiles y sólo puede diagnosticarse definitivamente mediante la evaluación de la respuesta a la administración de una dieta libre de gluten.^{ref(920)}

Intolerancia a la lactosa y otros trastornos de la absorción de carbohidratos.

El trastorno más frecuente de la malabsorción de carbohidratos es la intolerancia a la lactosa.^{ref(921)} Todos los niños poseen el mecanismo enzimático intestinal necesario para degradar el disacárido lactosa de la leche en sus componentes glucosa y galactosa, lo que permite su absorción. En las poblaciones que se alimentan con leche animal durante toda la vida, estos mecanismos enzimáticos persisten en la edad adulta. Sin embargo, en las poblaciones que históricamente no beben leche, este sistema enzimático sufre una regresión (negros Africanos y Orientales). Si los individuos que carecen de la enzima lactasa ingieren leche o productos lácteos, no se producirá la degradación adecuada de la lactosa. Este azúcar no absorbido generará una fuerza osmótica que atraerá líquido hacia la luz intestinal. Tal

fenómeno causará la aparición de cólicos, sensación de distensión y diarrea. Además, las bacterias del intestino grueso pueden metabolizar el azúcar y producir gas. Aunque la mayoría de las personas con intolerancia a la lactosa conocen su problema y evitan la ingestión de productos lácteos, existen individuos que padecen formas más leves de este trastorno y lo experimentan de un modo mucho menos evidente. El diagnóstico de malabsorción de lactosa se lleva a cabo mediante el empleo de pruebas de tolerancia a la lactosa discutidas más adelante en este capítulo. Se han publicado síndromes de malabsorción de otros disacáridos, pero estos casos son sumamente raros. La malabsorción de monosacáridos sólo se ve en casos de lesiones extremas de la superficie mucosa.

Síndrome carcinoide. ref(922)

El síndrome que consiste en la aparición de rubor vascular, diarrea, tumor carcinoide del intestino, insuficiencia tricuspídea ocasional y, raramente, pelagra se denomina *síndrome carcinoide*. Los tumores carcinoides más frecuentes del intestino delgado se encuentran localizados principalmente en el íleon distal. El resto de los tumores carcinoides gastrointestinales extraapendiculares se localizan en el recto y en el estómago. Estos tumores hacen metástasis con mayor frecuencia en los nódulos linfáticos regionales, hígado y huesos. Los tumores carcinoides primarios del apéndice son frecuentes pero raramente hacen metástasis mientras que los que se originan en otros sectores del tracto gastrointestinal sí lo hacen. Los tumores producen un importante exceso de serotonina y quininas. Estas sustancias hormonales anormales son responsables del síndrome clínico característico. Es posible detectar la presencia de este trastorno mediante la determinación de serotonina o sus metabolitos.

Enfermedades del intestino grueso

Diarrea. ref(923)

Se define como la producción excesiva de material fecal, generalmente debido a un exceso de agua en las heces. Las causas de diarrea son numerosas. La diarrea debe ser clínicamente diferenciada de la esteatorrea.

La diarrea severa provoca una disminución de sodio y agua, también una pérdida de potasio. Los trastornos del equilibrio ácido-base causados por la diarrea son variables. Sin embargo, el trastorno más común es la acidosis, por aumento de las pérdidas fecales de bicarbonato. En la diarrea crónica leve puede observarse una alcalosis hipokalémica.

Existen tres mecanismos principales para la diarrea: malabsorción de solutos, secreción de líquido en la luz intestinal y trastornos de la motilidad intestinal.

La malabsorción de solutos se debe a la ingestión de sustancias poco absorbibles, a un síndrome de “descarga” o a una malabsorción intestinal, como la intolerancia a la lactosa.

La secreción de líquido en el lumen intestinal ocurre en diversas condiciones. La secreción pasiva tendrá lugar si la permeabilidad del epitelio está aumentada debido a una obstrucción o a una inflamación. La secreción de aniones se producirá a través de la actividad del 3',5'-adenosin-monofosfato cíclico estimulada por la toxina del cólera, endotoxinas, prostaglandinas, ácidos biliares y ciertos productos tumorales (como el polipéptido intestinal vasoactivo). Otro mecanismo secretor consiste en el reemplazo del epitelio de absorción por un epitelio críptico, (como sucede en la gastroenteritis viral).

Los trastornos de la motilidad son provocados por los catárticos y la tensión nerviosa.

Estos factores causan un aumento de la motilidad y una disminución del tiempo de tránsito y por lo tanto de la eficacia de la absorción.

Cáncer.

Los tumores malignos del colon y del recto^{ref(924)} representan más de la mitad de los procesos malignos de la totalidad del sistema gastrointestinal. El índice de curación a los 5 años para estos tumores oscila entre un 25% y un 50%. El índice de curación es directamente proporcional a la rapidez con que la lesión es detectada y por lo tanto está relacionado con el grado de proximidad con respecto al ano. Así, la detección temprana representa el factor más importante en la curación de estos tumores a menudo fatales. El examen digital y sigmoidoscópico del recto es complementado por la evaluación de sangre oculta en las heces. Los estudios radiológicos solamente son útiles en la evaluación de pacientes en situación de riesgo elevado de cáncer. La colonoscopia se está volviendo el método de preferencia para la evaluación de pacientes en situación de riesgo elevado.

Síndromes del asa ciega.

Diversos trastornos inflamatorios y anatómicos del tracto gastrointestinal pueden causar la formación de bolsas ciegas en el intestino delgado.^{ref(925)} Estas bolsas pueden provocar un atrapamiento del material intestinal y permitir la hiperproliferación bacteriana. Si se produce este fenómeno, el exceso de bacterias puede inducir una degradación exagerada de los conjugados biliares. Cuando estas sustancias sufren una desconjugación no pueden ser reabsorbidas por el organismo y son eliminadas en las heces. Esto puede ser una causa de diarrea. Las pruebas de determinación de ácidos biliares en el aire espirado permiten establecer el diagnóstico en estos casos.

Trastornos intestinales comunes.

Los trastornos intestinales más comunes raramente representan un problema de diagnóstico químico y están asociados con una motilidad anormal. Síntomas como distensión, cólicos y excesiva flatulencia, constituyen problemas clínicos frecuentes. La enfermedad inflamatoria del colon puede ocasionar diarrea. La colitis puede estar causada por reemplazo de la flora normal del colon por *Clostridium difficile*^{ref(926)} y por una aumentada síntesis de óxido nítrico.^{ref(927)}

Hiperalimentación (Ver también capítulo 37)

En los últimos años se han desarrollado notablemente técnicas destinadas a proporcionar adecuada nutrición a individuos incapaces de ingerir alimentos.⁴⁸ Estas técnicas se basan en la alimentación por sonda o intravenosa. En el caso de los pacientes sometidos a una alimentación por sonda, es importante que el material administrado no produzca una sobrecarga osmótica en el tracto gastrointestinal que provoque la aparición de diarrea.

La evaluación de pacientes que reciben esta nutrición artificial no ha sido altamente desarrollada. En general, estas determinaciones deben permitir en primer lugar saber si han producido complicaciones o si existe una deficiencia de una o más sustancias. Los pacientes deben someterse a un cuidadoso control clínico. El examen bioquímico de la orina es de utilidad e incluye determinaciones de osmolalidad urinaria con el objeto de evaluar el grado de hidratación, el sodio y el potasio como indicios de la carga electrolítica, la concentración de

urea como una guía general del balance nitrogenado global y las cetonas y la glucosa para evaluar un posible trastorno de los carbohidratos y una pérdida calórica. Los análisis de sangre también son importantes, pero estos estudios deben ser interpretados con cautela, dado que la solución intravenosa administrada en el momento de la recolección de la muestra puede alterar en forma drástica los resultados debido a la afectación de la lipemia o a las fuerzas hiperosmóticas.

Pruebas Funcionales Gastrointestinales

Existen diversas pruebas funcionales gastrointestinales destinadas a la evaluación crítica de numerosas funciones fisiológicas del tracto gastrointestinal.

Prueba de la acidez gástrica

Las pruebas de acidez gástrica son necesarias para evaluar la capacidad de las células parietales de producir ácido clorhídrico. La detección de una aclorhidria (anacidez) es un firme indicio de la presencia de una anemia perniciosa y permitirá descartar la enfermedad ulcerosa péptica, centrando las sospechas en una úlcera o un carcinoma gástrico. La presencia de ácido en el estómago representa un firme indicio en contra de una anemia perniciosa. La determinación de ácido debe ser llevada a cabo para definir la importancia de la elevación de la concentración sérica de gastrina. La única prueba adecuada para determinar la presencia de ácido gástrico consiste en la intubación del paciente y la extracción de jugo gástrico. De ese modo será posible efectuar una medición directa del pH, el cual debe ser menor de 3. La anacidez solamente puede diagnosticarse si existe un pH mayor de 6.

Pruebas de estimulación gástrica

Análisis gástrico.

La prueba del análisis gástrico se basa en el drenaje de secreciones gástricas durante un período mínimo con el objeto de poder determinar la secreción basal o no estimulada de ácido. Luego se administra un estimulante de las células parietales y se recoge jugo gástrico para evaluar la capacidad secretora máxima. Actualmente, el estimulante recomendado es la pentagastrina, la porción de cinco aminoácidos activa de la gastrina. [refs\(928\)](#)

Por lo tanto, el procedimiento consiste en: 1) obtener el jugo gástrico residual de un paciente en ayunas mediante la aspiración intermitente por una sonda nasogástrica colocada en el interior del estómago bajo control fluoroscópico; 2) recolectar secreciones basales durante cuatro períodos de 15 minutos; 3) administrar pentagastrina por vía intramuscular en dosis de 5 (g/kg de peso, y 4) obtener nuevas muestras de la secreción gástrica durante seis períodos consecutivos de 15 minutos. Todas las muestras son evaluadas para determinar aspecto, presencia de sangre, bilis, pH, volumen, milimoles de H^+ por litro, milimoles de H^+ por volumen total y milimoles de H^+ por hora en cada muestra.

La determinación del pH es de utilidad. La presencia de un pH basal superior a 6 es casi seguramente debida a una anacidez; un pH inferior a 3 indica la presencia de una función celular parietal normal o excesiva; los valores intermedios (pH entre 3 y 6) no son diagnósticos y simplemente indican que existe un equilibrio entre el ácido clorhídrico y la cantidad de amortiguador. Después de la estimulación, los valores del pH deben descender a

menos de 2. Si este fenómeno no ocurre, es probable que exista un trastorno de la función celular parietal, el cual puede ser observado en la anemia perniciosa, carcinoma gástrico, anemia hipocrómica, artritis reumatoidea y mixedema. Luego debe estimarse la secreción ácida basal (SAB) estableciendo el promedio de la excreción de milimoles por hora en las tres muestras basales más próximas. La secreción ácida máxima (SAM) también es calculada como la media de los dos valores de postestimulación más elevados en milimoles por hora.

Los hombres adultos normales muestran una SAB de 2.2 a 2.7 mmol/hora, con un límite máximo absoluto superior a 5 mmol/hora. La SAM para hombres menores de 30 años es de 14 a 42 mmol/hora, y para hombres mayores de 30 años es de 3 a 33 mmol/hora. Los valores para las mujeres representan aproximadamente el 50% de los valores registrados en los hombres. Se han publicado tablas detalladas de valores normales,^{ref(929)} los cuales se resumen en la Tabla 30-3.

El síndrome de Zollinger-Ellison se caracteriza por una SAB elevada (Tabla 30-3). La SAM es generalmente sólo un 40% a un 60% superior a la SAB, dado que el estómago se encuentra próximo a un estado de estimulación máxima. En realidad, una proporción SAB/SAM superior al 60% es virtualmente patognómica del síndrome de Zollinger-Ellison. Si la SAM es superior a los 35 mmol/hora, es probable que exista una predisposición para la úlcera. En las personas mayores de 45 años esta predisposición es altamente probable. Una SAM inferior a 11 mmol/hora en un hombre menor de 30 años sugiere la existencia de un riesgo de úlcera péptica de escasa magnitud.^{ref(930)} El análisis gástrico es empleado por algunos cirujanos para determinar la naturaleza de la operación a llevar a cabo como tratamiento de la úlcera.

Prueba de la insulina de Hollander.

Esta prueba^{ref(931)} es utilizada para determinar si una vagotomía quirúrgica ha desnervado satisfactoriamente al estómago. En esta técnica, el paciente recibe insulina regular (0.15 unidades/kg de peso por vía intravenosa) con el objeto de provocar una hipoglucemia (glucosa plasmática, menor de 300 mg/L). La estimulación vagal es una respuesta normal a la hipoglucemia. Los individuos con una inervación vagal gástrica normal liberan ácido en respuesta a la hipoglucemia. Una desnervación satisfactoria se refleja en una SAM inferior a 0.05 mmol/hora, y el pH permanece por encima de 3.5. Esta prueba no siempre se lleva a cabo dado que generalmente es suficiente una evaluación clínica.

Prueba de estimulación de la gastrina.

El principio de la prueba de estimulación de la gastrina fue descrito anteriormente.^{refs(932)} La sangre para la determinación de la gastrina sérica se obtiene del paciente en ayunas. Luego se administra secretina (2 unidades/kg en bolo intravenoso) y se determina la gastrina sérica en muestras obtenidas a los 2, 5, 10, 15, 30 y 60 minutos. Un incremento absoluto de gastrina mayor de 110 pg/mL es un indicio positivo para el síndrome de Zollinger-Ellison. La administración de secretina tiene un pequeño efecto, o ninguno sobre los niveles de gastrina plasmática cuando la hipergastrinemia es debida a otras causas.

Prueba de Schilling (Ver también pág. 590).

La prueba de Schilling para determinar la absorción de vitamina B₁₂ permite evaluar



tanto la función gástrica como la función intestinal.^{ref(933)} El paciente ingiere vitamina B₁₂ marcada radiactivamente. Si la absorción es correcta, el material radiactivo será excretado en la orina. La vitamina B₁₂ es administrada con factor intrínseco o sin él para determinar si esta sustancia se encuentra ausente. Más específicamente, esta prueba se lleva a cabo de la siguiente manera.

Un paciente en ayunas recibe una preparación oral que contiene vitamina B₁₂ radiomarcada. Una hora más tarde se administra una inyección intramuscular de vitamina B₁₂ no marcada. Esta vitamina B₁₂ “fría” satura los sitios de fijación del organismo para la vitamina B₁₂, lo que impide el almacenamiento de la dosis oral “marcada”. Luego se recoge orina de 24 horas. La cantidad de radiactividad en la orina se determina como porcentaje de la dosis original.

Después de varios días, esta prueba puede ser repetida. Esta vez, la vitamina B₁₂ marcada radiactivamente es administrada con factor intrínseco. Nuevamente se obtiene una muestra de orina de 24 horas y se termina la cantidad de vitamina B₁₂ excretada. Pueden obtenerse tres resultados distintos (Tabla 30-4).

Si ambas partes de la prueba muestran una excreción mayor del 15%, la absorción de vitamina B₁₂ es normal y cualquier deficiencia de vitamina B₁₂ sérica es probablemente el resultado de un problema dietético.

Si la absorción de la vitamina B₁₂ administrada sola es deficiente, pero la absorción de la vitamina B₁₂ con factor intrínseco es normal, se puede suponer que existe una deficiencia de factor intrínseco. Esta situación es hallada en la anemia perniciosa clásica, gastrectomía y en los raros casos de factor intrínseco no funcional. Si la excreción de vitamina B₁₂ en orina es baja después de la administración de ambas preparaciones, puede presumirse la existencia de un defecto de absorción a nivel del íleon terminal. Este problema puede encontrarse en el esprue tropical, esprue no tropical, enteritis regional, resección intestinal, neoplasia o granuloma, malabsorción ileal selectiva para la vitamina B₁₂ (síndrome de Imerslund, raro); infestación por lombriz solitaria (*Diphyllobothrium latum*), proliferación bacteriana y deficiencia crónica de vitamina B₁₂.

Se ha empleado una prueba con administración de dos cápsulas (Dicopac, Amersham Corp., Arlington Heights, Illinois). En esta preparación se marcan radiactivamente dos formas de vitamina B₁₂ empleando diferentes isótopos del cobalto (⁵⁷Co, ⁵⁸Co). La ventaja de este procedimiento consiste en que es posible administrar ambas formas de vitamina B₁₂ unida y no unida prácticamente al mismo tiempo. De este modo se puede determinar la absorción mediante la obtención de una única muestra de orina de 24 horas. Se requieren técnicas especiales de conteo con el objeto de sustraer la influencia ejercida por un isótopo sobre el otro.

Pruebas de estimulación pancreática

La explicación de los trastornos de malabsorción depende de la evaluación de la capacidad secretora pancreática. Esta se lleva a cabo preferiblemente mediante las pruebas de estimulación pancreática descritas en el Capítulo 29.

Pruebas de absorción de grasas

La prueba definitiva para determinar la absorción de grasa consiste en la determinación cuantitativa de grasa en muestras seriadas de materia fecal, obtenidas mientras el paciente recibe una dieta que contiene una cantidad conocida de grasa. Debido a las serias dificultades que presenta la recolección de la muestra se ha propuesto una diversidad de posibilidades alternativas. Desafortunadamente, ninguna de ellas reemplaza por completo la capacidad diagnóstica de la determinación cuantitativa de grasa fecal.

Evaluación de la presencia de grasa.

Este estudio^{ref(934)} se lleva a cabo en primer lugar mediante la evaluación del peso y aspecto de la materia fecal. Un aspecto pálido y espumoso es virtualmente diagnóstico de una cantidad excesiva de grasa. Un método más fiable es la aplicación de una pequeña cantidad de materia fecal sobre un portaobjeto común y la tinción del preparado con un colorante específico para grasa. Los observadores experimentados son capaces de detectar una cantidad excesiva de grasa en un 80% de casos de malabsorción de grasa.

Determinación cuantitativa de grasa fecal.

Este procedimiento^{ref(935)} se realiza mediante la recolección de materia fecal durante tres días consecutivos. En los dos días que anteceden a la obtención de las muestras y durante el período de recolección, el paciente debe ingerir una dieta que contiene aproximadamente 100 g de triglicéridos de cadena mediana.

La forma más fácil de asegurar la ingestión de esta dieta es solicitando al paciente que ingiera su dieta normal con un suplemento de cuatro vasos de leche entera por día y dos cucharadas de aceite de maíz con cada comida.

La recolección de la materia fecal puede realizarse en bolsas de plástico. Estas bolsas son luego atadas y colocadas en latas de pintura de 18 litros previamente pesadas. Al llegar al laboratorio se determina el peso de la lata y de su contenido y se determina el peso de la recolección a través de la diferencia. Posteriormente se lleva a cabo el análisis químico en una alícuota de la mezcla de partes iguales de estas recolecciones de tres días.^{ref(936)}

Estimaciones de grasa en suero.

Otra prueba aproximada para evaluar la malabsorción de grasa consiste en la prueba de tolerancia a la grasa.^{ref(937)} Se obtiene una muestra de sangre en ayunas. El paciente recibe luego una comida con elevado contenido graso que consiste en 170 g de aceite de maíz. Luego se obtienen muestras de sangre a las 3 y 6 horas y se determina la cantidad total de grasa en estas muestras. Las muestras después de la comida grasa deben exhibir un mínimo de un 50% de aumento del contenido graso con respecto a los valores obtenidos en ayunas. Esta prueba posee poco valor diagnóstico.

Pruebas con isótopos.

Se administran triglicéridos de cadena mediana marcados radiativamente a pacientes en los que se sospecha una malabsorción de grasa.^{ref(938)} Después de un intervalo apropiado se obtiene una muestra de sangre y se determina su radiactividad. Se supone que la radiactividad detectada en la sangre es el resultado de una digestión y absorción satisfactoria de la grasa radiactiva. Desafortunadamente, el yodo radiactivo no es un marcador apropiado en este procedimiento debido a que debe unirse a grasas no saturadas y a que el tamaño de yodo

marcado distorsiona considerablemente la molécula de triglicérido, lo que la hace susceptible a una ruptura accidental. Por lo tanto, la absorción de yodo radiactivo a partir de estas sustancias puede no indicar una correcta absorción de la grasa. Se ha probado un triglicérido marcado con ^{14}C , el cual puede ser determinado en la sangre o en las heces, [ref\(939\)](#)

Pruebas de absorción de D-xilosa [ref\(940\)](#)

La D-xilosa es una aldopentosa que es absorbida por el intestino delgado. Se postula que la D-xilosa es absorbida en forma pasiva; por lo tanto, su absorción satisfactoria refleja la integridad del área de superficie del intestino delgado. Una vez absorbida se produce una pequeña alteración metabólica, pero al menos un 50% es excretado en la orina dentro de las siguientes 24 horas. Se ha observado que la cantidad de D-xilosa excretada en la orina en un período de 5 horas está íntimamente relacionada con la cantidad de D-xilosa absorbida en el tracto gastrointestinal.

Existen varias posibilidades para llevar a cabo esta prueba. El paciente debe ayunar durante una noche pero debe beber abundante cantidad de agua durante este período. Se han propuesto dos dosis. La mayoría de los autores proponen la disolución de 25 g de D-xilosa en aproximadamente 300 a 500 mL de agua. Los individuos más pequeños en tamaño pueden recibir 1 g/kg de peso hasta un total de 25 g. Nosotros hemos observado que una dosis de 5 g es adecuada. [ref\(941\)](#) Esta dosis es menos factible de provocar cólicos abdominales y probablemente sea más sensible dado que algunas personas con defectos de absorción son capaces de absorber una cantidad suficiente si reciben dosis mayores.

Después de la administración del azúcar, se obtiene muestras de orina en un período de 5 horas. En esta muestra se lleva a cabo un análisis cuantitativo de D-xilosa. Normalmente se observa la aparición en la orina de al menos un 25% de la dosis administrada en un período de 5 horas siempre que la función renal sea adecuada.

En los casos de los niños, en los que es difícil recoger muestras urinarias, pueden obtenerse muestras sanguíneas a la hora y a las 2 horas. La mayor parte de los individuos normales exhiben niveles plasmáticos mayores de 300 mg/L en una de las muestras. En los niños, los valores superiores a 100 mg/L deben ser considerados dentro de los límites normales.

Niveles reducidos de xilosa en orina o en plasma sugieren un defecto de absorción a nivel del yeyuno. También se pueden observar niveles bajos en ascitis, vómitos, retardo del vaciamiento gástrico, fallos de la recogida urinaria, consumo de altas dosis de aspirina y en los tratamientos con neomicina, colchicina, indometacina, atropina y en los casos de disminución de la función renal. Es posible observar niveles normales en individuos con defectos de absorción distribuido en un patrón salteado. Esta distribución de las lesiones permite la absorción de una cantidad suficiente de D-xilosa a nivel de la mucosa normal restante.

Prueba de tolerancia a la lactosa

Algunas personas padecen una deficiencia a nivel del sistema enzimático mucoso de la lactasa. Este defecto impide la hidrólisis normal de la lactosa y produce la aparición de distensión abdominal, cólicos y diarrea. La prueba de tolerancia a la lactosa es de utilidad para la rápida identificación de estos pacientes.

En esta prueba se administran 50 g de lactosa disueltos en agua por vía oral y se observa cuidadosamente la aparición de los síntomas.



El procedimiento corriente consiste en recoger una muestra basal y luego muestras de sangre a los 5, 10, 30, 60, 90 y 120 minutos. Estos especímenes son analizados con el objeto de determinar la presencia de glucosa. Los niveles de glucosa sanguíneos aumentarán si la lactosa ha sido adecuadamente hidrolizada y sus componentes absorbidos. La porción galactosa de la lactosa es rápidamente convertida en glucosa por el hígado. Las personas normales exhiben una elevación de glucosa superior a los 200 mg/L por encima de los valores basales. Los pacientes con deficiencia de lactasa presentan trastornos abdominales y una glucemia inferior a 100 mg/L.

Se ha observado que la forma más fiable para determinar la absorción de lactosa consiste en medir la cantidad de hidrógeno que aparece en el aire espirado después de la administración oral de lactosa.^{ref(942)} Las personas que carecen de lactasa no absorben lactosa, la cual pasa al intestino grueso en donde es metabolizada por las bacterias allí presentes. El hidrógeno es uno de los subproductos de esta acción bacteriana. El hidrógeno pasa rápidamente a la circulación y es eliminado en el aire espirado. Cromatógrafos especiales para la determinación de gas pueden detectar la presencia del hidrógeno tras la ingestión de lactosa. En una persona normal no hay paso de lactosa hacia el colon y por lo tanto se observan menos de 10 ppm de hidrógeno en el aire espirado. Los pacientes con una deficiencia de lactasa exhiben al menos una concentración de hidrógeno de 50 ppm. Una cantidad intermedia de hidrógeno en el aire espirado puede deberse a la administración de dosis importantes de lactosa y su significado diagnóstico es cuestionable.

El diagnóstico definitivo se establece mediante determinaciones enzimáticas tisulares efectuadas con muestras de biopsias de la mucosa intestinal.

Alteraciones Bioquímicas en Estados Patológicos (Tabla 30-5)

Gastrina

La concentración normal de gastrina^{ref(943)} en el suero de un individuo en ayunas es de 30 a 100 pg/mL. El incremento de la gastrina sérica puede deberse primariamente a una hiperplasia de las células G del antro, a una producción ácida anormal, como ocurre en la aclorhidria con hipergastrinemia compensatoria o en una retención antral después de una gastrectomía, gastrinomas y enfermedad renal (ver el cuadro debajo).

La presencia de una concentración de gastrina disminuida se observa en personas con hipotiroidismo y después de la administración de ácidos por vía oral, estreptozocina y fenformina.

Una elevación mínima de hasta 500 pg/mL no es diagnóstica de ningún trastorno específico y ocasionalmente puede observarse en individuos normales. Estos valores se deben a veces a la ingestión (o incluso al pensamiento o al olor) de alimentos, a la administración de insulina, a la presencia de un carcinoma gástrico maligno, feocromocitoma, hiperparatiroidismo, úlcera péptica, gastritis, cirrosis hepática, insuficiencia renal y artritis reumatoidea. Es posible observar algunos casos de síndrome de Zollinger-Ellison y anemia perniciosa con estos valores de gastrina, pero este fenómeno es inusual. Los valores que oscilan entre 500 y 1000 pg/mL son significativos y, cuando están acompañados por una hipersecreción ácida gástrica, son virtualmente diagnósticos de gastrinoma. Los pacientes con aclorhidria (producción disminuida de HCl) pueden tener la gastrina sérica en estos rangos de

valores^{ref(944)} pero pueden fácilmente distinguirse en base a pruebas secretorias ácidas. Estos valores se asocian con la ingestión de alimentos, administración de insulina, feocromocitoma, hiperparatiroidismo, insuficiencia renal, anemia perniciosa y síndrome de Zollinger-Ellison. Las concentraciones de gastrina sérica están también aumentadas en pacientes con resección masiva de intestino delgado como resultado de disminución de la depuración de gastrina o de la eliminación de un factor intestinal que normalmente suprime la liberación de gastrina.

Los valores superiores a 1000 pg/mL probablemente se deban a un síndrome de Zollinger-Ellison, a una anemia perniciosa o, raramente, a una gastritis atrófica crónica con anticuerpos anticélulas parietales. La mayor parte de síndromes Zollinger-Ellison muestran valores superiores a los 2000 pg/mL.

Si se considera la posibilidad de un síndrome de Zollinger-Ellison debe obtenerse una muestra de sangre en ayunas para determinar la concentración de gastrina. Los valores inferiores a 100 pg/mL permiten descartar un síndrome de Zollinger-Ellison. Los valores superiores al mencionado en personas con una función renal normal deberán ser sometidos a las pruebas de estimulación descritas anteriormente.

Concentraciones Séricas de Gastrina en Estados Patológicos	
Normal (30 a 100 pg/mL)	
Reducidas (< 30 pg/mL)	<p>Hipotiroidismo, administración oral de ácidos, estreptozocina, fenformina. Elevaciones mínimas (100 a 500 pg/mL)</p> <p>Personas normales (ocasionalmente, ingestión de alimentos, administración de insulina, carcinoma maligno del estómago, feocromocitoma, hipertiroidismo, hiperparatiroidismo, úlcera péptica, gastritis, cirrosis hepática, insuficiencia renal, artritis reumatoidea, síndrome de Zollinger-Ellison (inusual), anemia perniciosa (inusual)</p>
Elevaciones significativas (500 a 1000 pg/mL)	<p>Ingestión de alimentos, administración de insulina, feocromocitoma, hiperparatiroidismo, insuficiencia renal, anemia perniciosa, síndrome de Zollinger-Ellison</p>
Elevación muy importante (> 1000 pg/mL)	<p>Síndrome de Zollinger-Ellison, anemia perniciosa, gastritis atrófica crónica con anticuerpos contra células parietales (raro)</p>

Otras hormonas gastrointestinales

Polipéptido intestinal vasoactivo.

Se encuentran niveles plasmáticos elevados del PIV en algunos pacientes con un síndrome de diarrea líquida (síndrome de Verner-Morrison). Este síndrome posteriormente fue designado con las siglas “WDHA”, las cuales corresponden a las iniciales en inglés de sus principales características: *diarrea líquida*, *hipokalemia* e *hipoclorhidria* o *aclorhidria*. Este síndrome es raro y su frecuencia es aproximadamente 10 veces menor que el síndrome de Zollinger-Ellison; a veces forma parte de una neoplasia endocrina múltiple.(ver pág. 580).

En pacientes con el síndrome WDHA, generalmente se encuentra presente un tumor de



las células no-beta de los islotes pancreáticos (vipoma) (células D₁); aproximadamente la mitad de estos tumores son malignos. Puede haber tumores secretores de PIV en otra parte del organismo (como el carcinoma bronquial, probablemente de células de avena, o neuroblastoma retroperitoneal). En dosis elevadas, el PIV provoca vasodilatación con rubor facial, incrementa el flujo sanguíneo intestinal, induce la aparición de diarrea líquida e inhibe la secreción gástrica. La diarrea que es explosiva y consiste en hasta 30 deposiciones por día, genera una profunda hipokalemia (1 a 3 mmol/L).

El diagnóstico se lleva a cabo mediante la eliminación de las causas comunes de diarrea e hipokalemia. En las pruebas de secreción gástrica puede detectarse una hipoclorhidria y el diagnóstico es confirmado a través de las determinaciones de niveles sanguíneos elevados de PIV inmunorreactivo. [ref\(945\)](#) El pseudosíndrome de Verner-Morrison corresponde a pacientes con diarrea líquida, hipokalemia y aclorhidria con niveles séricos de PIV normales y sin evidencia de tumor.

Secretina.

Aunque los niveles de secretina sérica están elevados en los pacientes con hipersecreción gástrica, las medidas de secretinas no son generalmente requeridas para un diagnóstico.

Polipéptido pancreático.

Se ha observado que los niveles plasmáticos de PP se elevan considerablemente en un alto porcentaje de pacientes con vipomas, insulinomas, gastrinomas y glucagonomas. Los APUDomas de polipéptido pancreático puro (PPomas) son raros, aunque es posible encontrar una elevación de los niveles plasmáticos de PP en un tercio de los APUDomas pancreáticos.

Péptidos inmunorreactivos como el glucagón.

Un tumor de páncreas secretor de glucagón está asociado con diabetes, eritema cutáneo y una alta concentración de glucógeno plasmático. El diagnóstico puede confirmarse fácilmente por las determinaciones de niveles plasmáticos elevados de glucagón mediante técnicas de radioinmunoensayo.

Somatostatina.

Se han descrito numerosos tumores pancreáticos productores de somatostatina, y son ahora conocidos como *somatostinomas*. Estos tumores provocan un síndrome mal definido que incluye diarrea, enfermedad vesicular y diabetes. Dado que la somatostatina es un inhibidor sumamente potente de la liberación de péptidos, es utilizada como agente terapéutico en el tratamiento de tumores. La administración de análogos de la somatostatina de acción prolongada provoca inhibición de la secreción peptídica en varios pacientes con gastrinomas, glucagonomas y vipomas, con mejoría de los síntomas clínicos.

Pruebas de malabsorción

Examen de población.

La selección de pacientes con síndromes de malabsorción en la sociedad norteamericana se realiza mejor clínicamente. La población con mayores riesgos de padecer una malabsorción es la de edad avanzada. Las determinaciones bioquímicas en la evaluación



de la malabsorción no son muy sensibles; sin embargo, las determinaciones de albúmina sérica, calcio, vitamina B₁₂ y la realización de un frotis periférico para detectar la presencia de una macrocitosis y de una anemia ferropénica, constituyen un examen general del laboratorio razonable para la selección de pacientes con malabsorción. Si es necesario se llevarán a cabo pruebas más específicas para detectar la deficiencia de hierro. Las determinaciones de las vitaminas del grupo B no se encuentran generalmente disponibles pero son de utilidad en la población de edad avanzada y en los individuos alcohólicos e indigentes.

Los pacientes en los que se sospecha la existencia de un síndrome de malabsorción específico deben evaluarse de acuerdo con la probable patología. Los pacientes con esteatorrea y en los que se sospecha una malabsorción grasa deben ser sometidos primero a un examen visual de las heces. Posteriormente deberá efectuarse una evaluación rápida de una muestra de materia fecal sobre un portaobjeto a fin de detectar la presencia de fibras de carne o de un exceso de grasa. La determinación del caroteno es fácil de llevar a cabo y refleja la presencia de anormalidades groseras de la absorción grasa. Una prueba de absorción de la D-xilosa indicará si existen problemas de absorción generalizados. La malabsorción proteica es difícil de determinar bioquímicamente, y el nivel sérico de albúmina sólo se halla disminuido si existe una severa malabsorción de aminoácidos.

Caroteno.

El beta-caroteno,^{ref(946)} un pigmento natural, es un constituyente habitual de vegetales y frutas. Colectivamente, estos pigmentos se denominan carotenoides. La estructura química de los carotenoides consiste en dos anillos de 6 carbonos unidos por una cadena poliinsaturada de 18 carbonos. Son hidrófobos e insolubles en agua. En consecuencia, estas sustancias deben ser absorbidas en asociación con las grasas. Por consiguiente, en las condiciones clínicas en las que existen trastornos de la absorción grasa, la absorción de pigmentos carotenoides también está alterada y el caroteno sérico es inferior al normal. El intervalo normal para los valores del caroteno sérico es entre 500 y 2500 µg/L.

El caroteno sérico se encuentra disminuido en las dietas con escaso contenido de carotenos (dietas de escaso contenido vegetal), en la abetalipoproteinemia, en la anomalía de las lipoproteínas de Tangier, en la insuficiencia hepática y en un 86% de los pacientes con una malabsorción de grasa clínicamente significativa.

Un 14% de los pacientes con malabsorción de grasas exhibe una concentración sérica normal de caroteno. La concentración de caroteno depende de un equilibrio entre el grado de malabsorción y la ingestión oral de caroteno.

Vitamina A.

La vitamina A,^{ref(947)} es un alcohol derivado del beta-caroteno mediante la ruptura hidrolítica a nivel medio de la cadena poliénica de 18 carbonos. La vitamina A se encuentra solamente en los tejidos animales y en los productos de origen animal como la leche y la yema de huevo. Debido a su similitud estructural con el caroteno, también es hidrofóbica y debe ser absorbida juntamente con las grasas. Por consiguiente, la presencia en el suero de la vitamina A representa una estimación razonable de la capacidad del organismo para absorber grasas. Las concentraciones séricas de vitamina A son menos dependientes de la dieta que las concentraciones séricas de caroteno. La presencia de niveles séricos reducidos de vitamina A

se observa en asociación con malabsorción grasa y enfermedad hepática.

Dado que la determinación de la concentración sérica de vitamina A es considerablemente más difícil de llevar a cabo que la del caroteno sérico, y debido a que su utilidad diagnóstica no es significativamente mayor, esta prueba nunca ha sido ampliamente utilizada en la evaluación de la malabsorción de grasas.

Tripsina.

La determinación de tripsina en las heces ha sido propuesta como una prueba de determinación de insuficiencia pancreática.[ref\(948\)](#) En los lactantes y en los niños pequeños, la determinación de tripsina es mucho más fiable que en los adultos. Esto se debe a que existe una menor degradación colónica de las enzimas pancreáticas. La prueba más simple de la actividad de la tripsina consiste en aplicar un frotis de materia fecal en una película delgada de gelatina. Si existe tripsina, se observará una ruptura enzimática de la película de gelatina. Esta prueba es anormal en pacientes con insuficiencia pancreática significativa, excepto en los casos inusuales de defectos aislados de la amilasa o la lipasa. Sin embargo, algunos niños normales no producen una cantidad de tripsina suficiente como para degradar la gelatina. Aunque esta prueba posee una cierta validez en la evaluación, un indicio clínico firme de una insuficiencia pancreática es una indicación para llevar a cabo pruebas más específicas resumidas en el Capítulo 29.

Determinación de grasa fecal.[ref\(949\)](#)

Las personas que ingieren una dieta que contiene 100 g de grasa, excretan no más de 5 g de grasa fecal por día. La presencia de más de 10 g es un indicio firme de malabsorción de grasa. Si el paciente no cumple la dieta administrada pueden alterarse los resultados de esta prueba. La ingestión de una cantidad reducida de grasas puede enmascarar una malabsorción grasa mínima. Una ingestión grasa excesiva elevará el contenido fecal por encima de los 5 g.

Pruebas relacionadas con trastornos específicos

Sangre oculta en la materia fecal.

Dado que la sobrevida de los pacientes con cáncer intestinal depende de un diagnóstico temprano, el desarrollo de métodos fiables para la detección de un carcinoma intestinal es extremadamente importante.[ref\(950\)](#) Se dispone de numerosos reactivos coloreados que permiten detectar la presencia de trazas de hemoglobina en las heces. La mayor parte de éstos se basa en la capacidad de la hemoglobina y sus derivados de actuar como peroxidasas y catalizar la reacción entre el peróxido de hidrógeno y un compuesto orgánico cromogénico. Se ha empleado la benzidina, pero este agente es carcinógeno y por lo tanto no es actualmente recomendado como reactivo de laboratorio.

Existen varios sistemas comerciales para la determinación de la sangre oculta en materia fecal.[ref\(951\)](#) Estos métodos han sido evaluados por Morris y colaboradores,[ref\(952\)](#) quien recomienda la prueba del Hemoccult (Smith-Kline Bechman, Pittsburgh), como el método más adecuado. El problema fundamental en cualquier determinación de sangre oculta en las heces consiste en hallar un reactivo lo suficientemente sensible como para detectar la presencia de todas las pérdidas de sangre provocadas por diferentes tumores gastrointestinales y, al mismo tiempo, suficientemente específico como para que no se registre una cantidad excesiva de reacciones falsamente positivas.

La prueba del Hemocult se basa en la reacción de peroxidación del guayacol y no da resultados positivos en los casos de pérdidas sanguíneas insignificantes o en los casos de ingestión de carne. Además, este método es adecuado para ser utilizado por el paciente, dado que proporciona un sobre para colocar la muestra. Los laboratorios que desean componer su propio reactivo pueden emplear el método de Woodman.^{ref(953)} Cualquiera que sea el método utilizado, se recomienda la determinación de sangre oculta en alícuotas de tres deposiciones diferentes para lograr un óptimo resultado diagnóstico.

Antígeno carcinoembrionario.

El antígeno carcinoembrionario (CEA) es una glicoproteína que existe en abundancia en los tejidos derivados del entodermo (mucosa gastrointestinal, páncreas, pulmón).^{ref(954)} En el tracto gastrointestinal, esta sustancia está localizada en el glucocáliz de las células. Se encuentra en los tejidos fetales a las 12 semanas de gestación y se detectan niveles pico a las 22 semanas. Estos valores disminuyen hacia el final del tercer trimestre. No se sabe de qué manera el CEA ingresa en la circulación. Después de la resección de un tumor productor de CEA, esta sustancia desaparece en el curso de 2 a 4 semanas, muy probablemente debido a la degradación hepática.

Se han hallado numerosas glicoproteínas que muestran una reactividad inmunológica cruzada con el CEA. Estas glicoproteínas incluyen la sulfoglicoproteína fetal, el antígeno colónico normal y la glicoproteína normal. Este último antígeno también es conocido como antígeno colónico Be, antígeno colónico X, CEA colónico II y antígeno del cáncer colónico III.

Existen tres empleos clínicos posibles del CEA: detección, diagnóstico y tratamiento de los carcinomas del colon.^{ref(955)}

La determinación de CEA ha sido postulada como un método de detección de carcinomas ocultos del tracto gastrointestinal. Desafortunadamente, este método no es fiable debido a que el CEA está aumentado en una diversidad de trastornos colónicos, algunos de los cuales predisponen a la aparición de carcinoma colónico. Por ejemplo, el CEA se halla aumentado en un 20% de los pacientes con pólipos colorrectales. Por lo tanto, este método no es suficientemente específico como para poder recomendarlo como método de tamizaje.

Se han llevado a cabo numerosos estudios destinados a determinar si la medición del CEA tiene utilidad para confirmar el diagnóstico de cáncer colónico en pacientes individuales. Lamentablemente, esta determinación no es bastante fiable como para ser de valor en el diagnóstico de esta enfermedad potencialmente mortal. Por ejemplo, si un individuo presenta un 50% de probabilidades de padecer un cáncer de colon, la presencia de una determinación de CEA positiva aumenta estas probabilidades a un 80%. Por lo tanto no es recomendable como indicio preoperatorio de la presencia de un proceso maligno. La opinión al respecto del Instituto del Cáncer de los Estados Unidos es la siguiente:

Basándose en los datos actuales, no se puede recomendar el empleo independiente del CEA para establecer el diagnóstico de cáncer. Sin embargo, en un paciente con síntomas, un valor de cinco a diez veces mayor del límite normal superior, debe considerarse indicio firmemente sugestivo de la presencia de cáncer..... Está indicada la realización de estudios diagnósticos adicionales.^{ref(956)}

La aplicación de la determinación de CEA en el seguimiento de pacientes que han sido



tratados por cáncer colónico es una función bien demostrada de esta prueba. Con este propósito, el nivel de CEA debe ser determinado en el momento de la intervención quirúrgica para establecer un valor basal. Luego es necesario que transcurran 6 semanas antes de llevar a cabo la siguiente determinación. Si este nivel se encuentra elevado, debe demostrarse un aumento del título en las próximas semanas siguientes antes de efectuar un diagnóstico de cáncer residual. Si el nivel de CEA se encuentra reducido en la determinación correspondiente a la sexta semana es posible suponer que la lesión original ha sido extirpada por completo y deben llevarse a cabo nuevas determinaciones a intervalos regulares. Algunos autores piensan que la elevación progresiva del nivel de CEA es una indicación para una reoperación exploratoria. Sin embargo, aunque algunos pacientes presentan un título elevado de CEA causado por una diseminación local tratable quirúrgicamente, otros exhiben metástasis inoperables.

La concentración de CEA depende del tamaño del tumor y se correlaciona aproximadamente con el curso clínico de la enfermedad metastática. Desafortunadamente, a pesar de los numerosos informes excelentes en apoyo del empleo de esta prueba, la determinación de CEA no ha demostrado ser siempre fiable en los casos individuales.

El intervalo normal para el CEA es de 0 a 5 ng/mL. Sin embargo es posible observar títulos progresivamente elevados, indicativos de enfermedad, que se encuentran dentro de este intervalo. Un nivel normal de CEA no excluye la existencia de una neoplasia. Elevaciones leves de 5 a 10 ng/mL pueden ser provocadas por un proceso maligno o por tabaquismo importante, hepatopatía crónica, neumopatía crónica, enfermedad inflamatoria intestinal e insuficiencia renal crónica. Cuando estos valores llegan hasta 10 a 15 ng/mL, la existencia de un tumor maligno es sumamente probable, dado que menos de un 5% de las condiciones no malignas capaces de inducir un aumento de CEA producen valores dentro de este intervalo. Los valores superiores a 15 ng/mL sugieren firmemente la presencia de un proceso maligno.

Acido 5-hidroxiindolacético.

La presencia de rubor cutáneo y diarrea es un síndrome suficientemente común para justificar la solicitud de pruebas con el objeto de evaluar la posibilidad de un síndrome carcinoide. La prueba bioquímica más comúnmente llevada a cabo con este propósito es la determinación de ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA).^{ref(957)} Esta prueba es efectuada debido a que el producto bioquímico más común de este tumor es la serotonina, que se forma por conversión del triptófano en 5-hidroxitriptamina (serotonina), la cual es convertida en última instancia en 5-HIAA.

La cantidad de 5-HIAA detectada en la orina depende en gran medida del método empleado. Existen numerosas técnicas de examen de población para esta sustancia que son considerablemente inespecíficas y por lo tanto esta prueba no debe ser utilizada para hacer diagnósticos. Un enfoque apropiado consiste en realizar una selección de todos los casos en que se solicita determinación de 5-HIAA: aquellos que presentan un valor elevado deben ser sometidos a una prueba más específica.^{ref(958)} Normalmente se excretan en la orina hasta 15 mg de 5-HIAA en 24 horas. En los casos de síndrome carcinoide generalmente se excretan más de 25 mg. Hay resultados falsamente negativos que pueden deberse a numerosas drogas, incluyendo la p-clorofenilalanina, corticotropina, etanol, imipramina, isoniazida, inhibidores de la monoaminoxidasa, metenamina, metildopa y fenotiazinas. La reducción de un valor elevado también se observa en la enfermedad renal y en la fenilketonuria.

En el síndrome carcinoide, los resultados oscilan generalmente entre 25 y 1000 mg/día. Se han registrado resultados falsamente positivos en el esprue no tropical, obstrucción intestinal, embarazo, falta de sueño, carcinoma pulmonar a células de grano de avena y en la ingesta de plantas, bananas, berenjenas, ananás, ciruelas y nueces. Las drogas asociadas con una elevación de los niveles de 5-HIAA incluyen acetanilida, efedrina, mefenesina, nicotina, fenacetina fenobarbital, fentolamina, rawolfia, reserpina, metocarbamol y medicamentos antitusígenos que contengan guayacolato de glicerol.

Prueba de ^{14}C -ácidos biliares en el aire espirado.

El empleo del análisis del aire espirado en gastroenterología ha sido exhaustivamente revisado por Newman. [ref\(959\)](#) La prueba más frecuentemente utilizada en el aire espirado es la determinación de ácidos biliares marcados con ^{14}C (radiactivo). [ref\(960\)](#) En esta técnica se administra por vía oral glicina-1- ^{14}C -colato. Si el paciente posee un asa ciega intestinal u otra fuente de proliferación bacteriana, se produce una desconjugación del marcador, lo que permite al ^{14}C ingresar en la circulación. Allí el ^{14}C es metabolizado para formar $^{14}\text{CO}_2$. El $^{14}\text{CO}_2$ del aire espirado es recogido en una solución alcalina y la posterior detección de radiactividad representa un indicio sensible de la existencia de una hiperproliferación bacteriana.

Pruebas para la enfermedad celíaca.

La detección de anticuerpos circulantes contra el gluten ha sido sugerida como un medio de identificar a las personas con enfermedad celíaca. [ref\(961\)](#) Esta prueba no es lo bastante sensible o específica como para ser llevada a cabo rutinariamente.

IgA.

Una prueba de utilidad en pacientes con diarrea crónica de causa desconocida consiste en la determinación de la concentración sérica de inmunoglobulina A (IgA). Aproximadamente 1 de cada 800 personas padecen una deficiencia idiopática de IgA. Estos individuos no poseen defensas inmunológicas normales para proteger el sistema de membranas mucosas y por lo tanto son susceptibles a la infestación por parásitos. [ref\(962\)](#) Si se descubre que un paciente padece una deficiencia de IgA, se aconseja efectuar una intubación intestinal con biopsia de la mucosa para detectar la posible presencia de parásitos como *Giardia lamblia*.

Oxalatos urinarios.

El metabolismo del oxalato es sumamente complejo. Un componente esencial de su ciclo bioquímico es la circulación enterohepática de glioxalatos secretados en la bilis y posteriormente reabsorbidos por el intestino. En pacientes sometidos a intervenciones quirúrgicas gastrointestinales, que sufren una enfermedad inflamatoria intestinal crónica o padecen anormalidades gastrointestinales crónicas, es posible que exista una reabsorción excesiva de oxalatos, los cuales provienen de la degradación de productos de excreción. Estos individuos excretan una gran cantidad de oxalato en la orina y son propensos a la formación de cálculos renales de oxalato. Por lo tanto, es recomendable evaluar el oxalato urinario en cualquier paciente que padezca una anormalidad intestinal anatómica o fisiológica de evolución crónica. [ref\(963\)](#)



Indicán.

Algunas bacterias intestinales (incluyendo la *Escherichia coli* y las especies *Bacteroides*) contienen la enzima triptofanasa, capaz de metabolizar el triptófano de la dieta para convertirlo en indol. Este producto es luego absorbido, convertido en indicán en el hígado y excretado en la orina.^{ref(964)} Por lo tanto, la determinación de indicán en una muestra de orina de 24 horas ha sido sugerida como medio de diagnosticar la contaminación bacteriana del intestino delgado. Sin embargo, no siempre es posible detectar un aumento del indicán urinario, dado que las bacterias predominantes pueden no contener esta enzima. Además, otras enfermedades del intestino delgado que provocan malabsorción pueden estimular la excreción de indicán como consecuencia de la absorción del triptófano de la dieta. Por, consiguiente, las determinaciones del indicán urinario sólo se correlacionan groseramente con las anormalidades del tracto gastrointestinal y esta prueba no es recomendable para ser empleada en el diagnóstico de rutina de las condiciones patológicas gastrointestinales. Esta determinación es solicitada frecuentemente por médicos homeopáticos, los cuales interpretan a su modo estos resultados. Es interesante mencionar que esta prueba permitió identificar el primer caso conocido de enfermedad de Hartnup.

Folato sérico.^{ref(965)}

Las determinaciones de folato son ampliamente utilizadas en la evaluación de la malabsorción. Los valores de folato obtenidos en los eritrocitos refleja una situación crónica, mientras que los niveles séricos reflejan las modificaciones diarias del folato de la dieta. Ocasionalmente es posible observar un aumento de la concentración sérica de folato en la anemia perniciosa. La disminución del folato sérico se observa en una serie de trastornos en los que existe una disminución de la capacidad de absorción del intestino delgado, incluyendo la enfermedad de Whipple, mielofibrosis, hipotiroidismo, esprue celíaco, abetalipoproteinemia, deficiencia de vitamina B₆, enteritis regional, ileítis, colitis ulcerosa, necrosis aguda y subaguda del hígado, procesos malignos y síndrome de Down.

Vitamina B₁₂.

Un artículo reciente^{ref(966)} ha llamado la atención sobre la dudosa validez de las determinaciones séricas de vitamina B₁₂. Este artículo puntualiza que numerosas pruebas actuales disponibles para las determinaciones de vitamina B₁₂ detectan la presencia de análogos de esta vitamina no fisiológicamente activos. Por lo tanto, estas sustancias pueden generar resultados normales en pacientes con deficiencia de vitamina B₁₂. Es posible encontrar una concentración reducida de vitamina B₁₂ (menos de 150 pg/mL) en la anemia perniciosa, enfermedad gástrica, enfermedad tiroidea, lesiones ileales, malabsorción y dietas vegetarianas. El aumento de la concentración de vitamina B₁₂ se detecta en casos de administración de dicha vitamina, lesiones tisulares hepáticas, leucemia y linfoma.(ver pág. 783 & 790)

Métodos de Análisis

Prueba de Schilling revisada

Steven C. Kazmierczak

Principios de análisis y usos corrientes.

La deficiencia de vitamina B₁₂ puede ocurrir como resultado de muchos mecanismos. La prueba de Schilling es un procedimiento para determinar la patogénesis de una deficiencia de vitamina B₁₂. Normalmente, la vitamina B₁₂ ingerida se une al factor intrínseco secretado por las células parietales del estómago. El complejo vitamina B₁₂-factor intrínseco es luego unido por receptores proteicos específicos localizados en la porción terminal del íleon. Esta vitamina B₁₂ entra a la circulación y se almacena en el hígado. Una vez que los sitios de almacenamiento del hígado se saturan, el exceso de vitamina B₁₂ es excretado sin modificar por la orina.

La prueba original descrita por Schilling en 1953^{ref(967)} para cuantificar la absorción de vitamina B₁₂ ha sufrido varias modificaciones. La prueba puede desarrollarse en hasta tres etapas diferentes para determinar el mecanismo exacto responsable de la deficiencia de vitamina B₁₂. Están disponibles revisiones recientes que plantean la base fisiológica y el uso de la prueba de Schilling como una prueba diagnóstica.^{ref(968)} En la prueba de Schilling clásica, o primera etapa, se le administra al paciente una inyección intramuscular de vitamina B₁₂ no marcada. Este bolo de vitamina B₁₂ satura los sitios de almacenamiento del organismo para dicha vitamina. Esta dosis puede darse antes o después de la administración de vitamina B₁₂ marcada. Idealmente, la dosis inicial debe ser administrada 6 horas después de la dosis oral. Esto es porque la vitamina B₁₂ administrada oralmente no comienza a atravesar la pared del íleon hasta las 6 horas de su ingestión. Sin embargo, si la dosis inicial se da más de 6 horas después de la administración de la dosis oral los sitios tisulares no pueden saturarse antes de la absorción de la vitamina B₁₂ marcada. Generalmente, por conveniencia, la dosis inicial es administrada al mismo tiempo que la dosis oral, o hasta 1 hora después. A los pacientes bajo terapia con vitamina B₁₂ se les puede hacer la prueba de Schilling, aunque el tratamiento debería interrumpirse 1 semana antes de la realización prueba.

Se le suministra al paciente una dosis de vitamina B₁₂ radiomarcada con ⁵⁷Co. Si el mecanismo de absorción de vitamina B₁₂ del paciente funciona correctamente, la vitamina B₁₂ marcada entrará en la circulación y, debido a que todos los sitios de almacenamiento de esta vitamina están saturados, será excretada en la orina. La cantidad de vitamina B₁₂ marcada con ⁵⁷Co excretada en la orina recogida durante las 24 a 72 horas después de su ingestión es proporcional a la cantidad de vitamina absorbida.

Se puede considerar que las personas con una absorción normal de vitamina B₁₂ después de esta primera etapa de la prueba tienen un mecanismo de absorción adecuado para la vitamina B₁₂. En los casos de una inadecuada absorción, se debe realizar la segunda etapa de la prueba de Schilling.

La segunda etapa es similar a la primera excepto que la vitamina B₁₂ radiomarcada es administrada con el factor intrínseco. Si la absorción de vitamina B₁₂ es ahora hallada normal, el defecto en la absorción de dicha vitamina es causado por la deficiencia o defecto del factor intrínseco. Sin embargo, si la vitamina B₁₂ no es absorbida aún después de la segunda etapa de la prueba, se debe realizar la tercer etapa. La tercer etapa de la prueba de Schilling es desarrollada para determinar si hay un problema con la absorción en el íleon atribuible a un

sobrecrecimiento bacteriano, síndrome de asa ciega, o infestación por lombriz solitaria (*Diphyllobothrium latum*).^{ref(969)} Se le hace al paciente un tratamiento completo con antibióticos o antihelmínticos durante varias semanas antes de realizar la prueba. Una vez que se ha completado el tratamiento, se repite la primera etapa de la prueba de Schilling. Si la absorción de vitamina B₁₂ es hallada ahora dentro de los valores normales, la causa de la deficiencia de vitamina es el resultado de un sobrecrecimiento bacteriano o de una infestación con lombriz solitaria.

Se han desarrollado técnicas que permiten la determinación simultánea de la primera y segunda etapa de la prueba de Schilling.^{ref(970)} En este caso, vitamina B₁₂ radiomarcada con ⁵⁸Co es administrada junto con vitamina B₁₂ marcada con ⁵⁷Co unida a factor intrínseco. Esto permite la simultánea determinación de la primer y segunda etapa de la prueba de Schilling. El contador de centelleo de rayos gamma debe ser optimizado para cada isótopo para diferenciar entre ⁵⁷Co y ⁵⁸Co.^{ref(971)}

Muestra.

Se debe usar una orina de 24, 48, o 72 horas, aunque es más frecuentemente utilizada la orina recogida en un período de 24 horas. La recolección incompleta de orina es una causa frecuentemente señalada de resultados imprecisos.^{ref(972)} La determinación de creatinina en orina puede dar información sobre la adecuada recogida de la orina.^{ref(973)}

Intervalos de referencia.

Los siguientes son los intervalos de referencia sugeridos para la primera y segunda etapa de la prueba de Schilling:

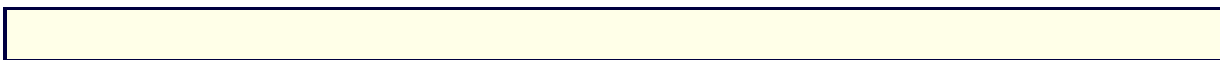
1. Primera etapa: la excreción de vitamina B₁₂ debe ser mayor de 8% a 15%.
2. Segunda etapa: la excreción de vitamina B₁₂ marcada debe ser mayor de 8% a 15%.

Referencias

1. Moog F: The lining of the small intestine, *Sci Am* 245:154-176, 1981.
2. Track NS: The gastrointestinal endocrine system, *Can Med Assoc J* 122:287-291, 1980.
3. Rayford PL, Miller TA, Thompson JC: Secretin, cholecystokinin and newer gastrointestinal hormones, *N Engl J Med* 294:1093-1101, 1157-1164, 1976.
4. Ingelfinger FJ: Gastrointestinal absorption, *Nutrition Today*, pp 2-10, March 1967.
5. Dawson AM: The absorption of disaccharides. In Card WI, Creamer B, editors: *Modern trends in gastroenterology*, vol 4, London, 1970, Butterworth.
6. McColl I, Sladen GEC, editors: *Intestinal absorption in man*, New York, 1975, Academic Press.
7. Wilson FA, Dietschy JM: Differential diagnostic approach to clinical problems of malabsorption, *Gastroenterology* 61:911-921, 1971.
8. Wiss O, Gloor U: Absorption, distribution, storage and metabolites of vitamin K and related quinones, *Vitam Horm* 24:576-586, 1966.
9. DeLuca HF, Suttie JW, editors: *The fat soluble vitamins*, Madison, Wisc., 1970, University of Wisconsin Press.
10. Holdsworth CD: *Calcium absorption in man*. In McColl I, Sladen GEG, editors: New York, 1975,



- Academic Press.
11. Martiner-Torres C, Layrisse M: Nutritional factors in iron-deficiency: food iron absorption, *Clin Hematol* 2:339-352, 1973.
 12. Bloom SR, Polak JM: In Glass B, editor: *Progress in gastroenterology*, New York, 1977, Grune & Stratton.
 13. McGuigan JE: Gastrointestinal hormones, *Annu Rev Med* 29:307, 1978.
 14. Rehfeld JF: Gastrointestinal hormones. In Crane RK, editor: *International review of physiology: gastrointestinal physiology III*, vol 19, Baltimore, 1979, University Park Press.
 15. Dockray GJ: Gastrin overview. In Bloom SR, editor: *Gut hormones*, Edinburgh, 1978, Churchill Livingstone.
 16. Strunz UT, Walsh JH, Grossman MI: Stimulation of gastrin release in dogs by individual amino acids, *Proc Soc Exp Biol Med* 157:440-441, 1978.
 17. Polak JM, Pearse AGE, Joffe SN, et al: Quantification of secretin release by acid using immunocytochemistry and radioimmunoassay, *Experientia* 31:462-464, 1975.
 18. Rayford PL, Miller TA, Thompson JC: Secretin cholecystokinin, and newer gastrointestinal hormones, *N Engl J Med* 294:1093-1101, 1976.
 19. Schaffalitzky de Muckadell OB, Fahrenkrug J, Watt-Boolsen S, et al: Pancreatic response and plasma secretin concentration during infusion of low dose secretin in man, *Scand J Gastroenterol* 13:305-311, 1978.
 20. Bryant MG, Bloom SR, Polak JM, et al: Possible dual role for vasoactive intestinal peptide as gastrointestinal hormone and neurotransmitter substance, *Lancet* 1:991-993, 1976.
 21. Lin TM, Evans DC, Chance RE, et al: Bovine pancreatic polypeptide: action on gastric and pancreatic secretion in dogs, *Am J Physiol* 232:E311-E315, 1977.
 22. Anderson D, Elahi D, Brown JC, et al: Oral glucose augmentation of insulin secretin, *J Clin Invest* 62:152-161, 1978.
 23. Grimelius L, Polak JM, Solcia E, et al: *Gut hormones*, Edinburgh, 1978, Churchill Livingstone.
 24. Polak JM, Pearse AGE, Grimelius L, et al: Growth hormone release\Ninhibiting hormone in gastrointestinal and pancreatic D cells, *Lancet* 1:1220-1222, 1975.
 25. Creutzfeldt W, Arnold R: Somatostatin and the stomach: exocrine and endocrine aspects, First International Somatostatin Symposium, Freiburg, Germany, 1977, *Metabolism* 27:1309-1315, 1978.
 26. Raptis S, Gerich JE: Foreword, First International Somatostatin Symposium, Freiburg, Germany, 1977, *Metabolism* 27:1129-1130, 1978.
 27. Vale W, Rivier C, Brown M: Regulatory peptides of the hypothalamus, *Annu Rev Physiol* 39:473-527, 1977.
 28. Pearson WN: Assessment of nutritional status: biochemical methods. In Beaton GH, McHenry EW, editors: *Nutrition: a comprehensive treatise*, New York, 1966, Academic Press.
 29. Mirsky IA: Physiologic, psychologic, and social determinants in the etiology of duodenal ulcer, *Am J Dig Dis* 3:285-314, 1958.
 30. Grossman MI: Elevated serum pepsinogen I: a genetic marker for duodenal ulcer disease, *N Engl J Med* 300:89, 1979.
 31. Grossman MI, Guth PH, Isenberg JI, et al: A new look at peptic ulcer, *Ann Intern Med* 84:57-67, 1976.
 32. Genta RM: Counting angels and bacteria: the quest for a unifying theory of ulcerogenesis: an editorial, *Am J Clin Pathol* 98:549-551, 1992.
 33. Forbes GM, Glaser ME, Cullen DJE, et al: Duodenal ulcer treated with *Helicobacter pylori* eradication: seven year follow-up, *Lancet* 343:258-260, 1994.
 34. Shahon BB, Horowitz S: Cancer of the stomach: analysis of 1152 cases, *Surgery* 39:204-221, 1956.
 35. The Eurogastric Study Group: An international association between *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer, *Lancet* 341:1359-1362, 1993.
 36. Deveney CW, Deveney KS, Way LW: The Zollinger-Ellison syndrome -23 years later, *Ann Surg*



- 188:384-393, 1978.
37. Walsh JH, Grossman MT: Gastrin, *N Engl J Med* 292:1324-1334, 1377-1384, 1975.
 38. Johnson GJ, Somerskill WHK, Anderson VE: Clinical and genetic investigation of a large kindred with multiple endocrine adenomatosis, *N Engl J Med* 277:1379-1386, 1967.
 39. Ippoliti AF: Zollinger-Ellison syndrome: provocative diagnostic tests, *Ann Intern Med* 87:787-788, 1977.
 40. Deveney CW, Deveney KS, Jaffe BM, et al: Use of calcium and secretin in the diagnosis of gastrinoma, *Ann Intern Med* 87:680-686, 1979.
 41. Trier JS: Celiac sprue (review article), *N Engl J Med* 325:1709-1719, 1992.
 42. Gray GM: Congenital and adult intestinal lactose deficiency, *N Engl J Med* 294:1057-1058, 1976.
 43. Kuehn PG, Coley GM, Christine B: Carcinoid syndrome: a study of 16 cases, *Hartford Hosp Bull* 28:305-307, 1973.
 44. Jeejeebhoy KN: Symposium on diarrhea. I. Definition and mechanisms of diarrhea, *Can Med Assoc J* 116:737-738, 1977.
 45. Gilbertson VA: The earlier diagnosis of adenocarcinoma of the large intestine, *Cancer* 27:143-149, 1971.
 46. Kelly CP, Pothoulakis C, LaMont JT: Clostridium difficile colitis (review article), *N Engl J Med* 330:257-262, 1994.
 47. Middleton SJ, Shorthouse M, Hunter JO: Increased nitric oxide synthesis in ulcerative colitis, *Lancet* 341:465-466, 1993.
 48. Walravens PA: Keeping TPN on course with lab monitoring, *Diagn Med* 4:38-43, 1981.
 49. Ward S, Gillespie IE, Passaro ER, et al: Comparison of Histalog and histamine as stimulants for maximal gastric secretions in human subjects and in dogs, *Gastroenterology* 44:620-626, 1963.
 50. Abernethy RJ, Gillespie IE, Lowrie JH, et al: Pentagastrin as a stimulant of maximal gastric acid response in man: a multicentre pilot study, *Lancet* 1:291-295, 1967.
 51. Kirsner JB, Ford H: The gastric secretory response to Histalog: one-hour basal and Histalog secretion in normal persons and in patients with duodenal ulcer and gastric ulcer, *J Lab Clin Med* 46:307-311, 1955.
 52. Blackman AH, Lambert DL, Thayer WR, et al: Computed normal values for peak acid output based on age, sex and body weight, *Am J Dig Dis* 15:783-789, 1970.
 53. McNeely MDD: Gastrointestinal function. In Sonnenwirth AC, Jarett L, editors: *Gradwohl's clinical laboratory methods and diagnosis*, ed 8, St. Louis, 1980, Mosby.
 54. Herbert V: Detection of malabsorption of vitamin B12 to gastric or intestinal dysfunction, *Semin Nucl Med* 2:220-234, 1972.
 55. Drummey GD, Benson JA, Jones CM: Microscopical examination of the stool for steatorrhea, *N Engl J Med* 264:85-87, 1961.
 56. Massion CG, McNeely MD: Accurate micromethod for estimation of both medium- and long-chain fatty acids and triglycerides in fecal fat, *Clin Chem* 19:499-505, 1973.
 57. Schwartz L, Woldow A, Dunsmore R: Determination of fat tolerance in patients with myocardial infarction: method utilizing serum turbidity changes following a fat meal, *JAMA* 149:364-366, 1952.
 58. Silver S: *Radioactive isotopes in medicine and biology*, Philadelphia, 1962, Lea & Febiger.
 59. Kaihara S, Wagner HN Jr: Measurement of intestinal fat absorption with carbon-14 labeled tracers, *J Lab Clin Med* 71:400-411, 1968.
 60. Benson JA, Culver PJ, Ragland S, et al: The d-xylose absorption test in malabsorption syndromes, *N Engl J Med* 256:335-339, 1957.
 61. Santini R, Sheehy TW, Martinez-de-Jesus J: The xylose tolerance test with a five-gram dose, *Gastroenterology* 40:772-774, 1961.
 62. Newcomer AD, McGill DB, Thomas PJ, Hofmann AF: Prospective comparison of indirect methods for detecting lactase deficiency, *N Engl J Med* 293:1232-1235, 1975.
 63. Parkinson CE, Gal I: Factors affecting the lab management of human serum and liver vitamin A analysis, *Clin Chim Acta* 40:83-90, 1972.

64. Onstad GR, Zieve L: Carotene absorption: a screening test for steatorrhea, *JAMA* 221:677-679, 1972.
65. Erlanger BF, Kokowsky N, Cohen W: The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin, *Arch Biochem Biophys* 95:271-278, 1961.
66. Winawer SJ, Sherlock P, Schottenfeld D, Miller DG: Screening for colon cancer, *Gastroenterology* 70:783-789, 1976.
67. Christensen F, Anker N, Mondrop M: Blood in feces: a comparison of the sensitivity and reproducibility of five chemical methods, *Clin Chim Acta* 57:23-27, 1974.
68. Morris DW, Lee CS, Hansell JR: *Presentation at the annual meeting of the American Gastroenterological Society*, San Francisco, 1974.
69. MaKarem A: Hemoglobins, myoglobins and haptoglobins. In Henry RJ, Cannon DC, Winkelman J, editors: *Clinical chemistry principles and technics*, New York, 1974, Harper & Row.
70. Gold P, Freedman SO: Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system, *J Exp Med* 122:467-481, 1965.
71. Meeker WR: The use and abuse of the CEA test in clinical practice, *Cancer* 41:854-862, 1978.
72. National Institutes of Health Consensus Conference: Carcinoembryonic antigen: its role as a marker in the management of cancer, *Br Med J* 282:373-375, 1981.
73. Tracy RP, Wold LE, Jones JD, Burritt ME: Colorimetric vs. liquid-chromatographic determination of urinary 5-hydroxyindole-3-acetic acid, *Clin Chem* 27:160-162, 1981.
74. Newman A: Breath-analysis tests in gastroenterology, *Gut* 15:1-15, 1974.
75. McNeely MDD: Breath test $^{14}\text{CO}_2$. In Pesce AJ, Kaplan LA, editors: *Clinical chemistry: a laboratory and managers' infobase*, Cincinnati, 1996, Pesce Kaplan Publishers.
76. Baker PG, Barry RE, Read AE: Detection of continuing gluten ingestion in treated coeliac patients, *Br Med J* 1:486-488, 1975.
77. Jones EA: Immunoglobulins and the gut, *Gut* 13:825-835, 1972.
78. Stauffer JQ, Humphreys MH, Weir GJ: Acquired hyperoxaluria with regional enteritis after ileal resection, *Ann Intern Med* 79:383-391, 1973.
79. Holdsworth CD: Intestinal and pancreatic function. In Brown SS, Mitchell FL, Young DS, editors: *Chemical diagnosis of disease*, New York, 1980, Elsevier/North Holland.
80. Rosenberg IH, Godwin HA: The digestion and absorption of dietary folate, *Gastroenterology* 60:445-463, 1970.
81. Kolhouse JF, Kondo H, Allen NC, et al: Cobalamin analogues are present in human plasma and can mask cobalamin deficiency because current radioisotope dilution assays are not specific for true cobalamin, *N Engl J Med* 299:785-792, 1978.
82. Schilling RF: Intrinsic factor studies. II. The effect of gastric juice on the urinary excretion of radioactivity after the administration of vitamin B₁₂, *J Lab Clin Med* 42:860-866, 1953.
83. Nickoloff E: Schilling test: physiologic basis for and use as a diagnostic test, *Crit Rev Clin Lab Sci* 26:263-276, 1988.
84. Streeter AM, Bathur FA, Arnold BJ, et al: Limitations of the Schilling test, *Lancet* 1:39-40, 1981.
85. Katz JH, DiMase J, Donaldson RM Jr: Simultaneous administration of gastric juice\Nbound and free radioactive cyanocobalamin, *J Lab Clin Med* 82:266, 1963.
86. Atrah HI, Davidson RJ: A survey and critical evaluation of a dual isotope (Dicopac) vitamin B₁₂ absorption test, *Eur J Nucl Med* 15:57-60, 1989.
87. Heironimus JD, Borchert RD, Weiland FL: The value of urine creatinine analysis in the evaluation on Schilling tests, *Clin Nucl Med* 15:181-182, 1990.

Tablas



Tabla 30-1. Procesos químicos para la digestión de la comida.

Material alimenticio	Acción digestiva	Producto final
Almidón	Amilasa pancreática	Disacáridos (principalmente maltosa)
Disacáridos	Disacaridasa de la mucosa	Monosacáridos
Monosacáridos	Ninguna	
Proteínas	Ácido clorhídrico y pepsina gástricos	Degradación parcial en polipéptidos grandes
	Tripsina, quimotripsina y carboxipeptidasa pancreática	Polipéptidos, dipéptidos y aminoácidos
Triglicéridos de cadena larga	Emulsión con bilis, hidrólisis por la lipasa	Ácidos grasos y glicerol

Tabla 30-2. Hormonas intestinales.

Hormona	Número de aminoácidos	Origen	Factor estimulante	Función
Colecisto-quinina	33	Mucosa del intestino delgado superior en el duodeno	Aminoácidos, ácidos grasos y ácido clorhídrico y alimentos	Estimula la secreción de enzimas pancreáticas, la contracción de la vesícula, contracción del estómago y el píloro, motilidad intestinal
Gastrina lumen	14 – 34	Estómago, digestión de ácido intestinal	Productos de ácido estomacal, proteínas, alimentos en el duodeno	Estimula la secreción de enzimas gástricas, motilidad gástrica, crecimiento de la mucosa gástrica
Secretina	27	En toda la mucosa intestinal pero concentrada en el duodeno	Ácido en el duodeno	Estimula la secreción pancreática de agua y bicarbonato, la secreción gástrica de pepsina;relaja el esfínter pilórico
Motilina	22	Intestino delgado	Comidas ricas en grasas,	Estimula la motilidad del

		superior	acidificación duodenal	intestino delgado y del duodeno
Glucagón	29	Pancreática y Intestinal mucosa	Arginina, alanina, estrés	Estimula la gluconeogénesis, eleva la glucosa sanguínea
Polipéptido inhibidor gástrico (PIG)	43	Mucosa duodenal	Glucosa y grasa a la colecistoquinina	Actividad similar
Polipéptido intestinal vasoactivo (PIV)	28	Ampliamente distribuido en todo el intestino		Efectos vasodilatadores e hipotensores; inhibe la histamina, la liberación de ácido estimulada por la pentagastrina y la secreción de pepsina, estimula la secreción hidroelectrolítica a nivel pancreático y el flujo biliar
Entero-Glucagón (péptidos similares al glucagón)	29	Intestino delgado inferior	Comida	Inhibe el tránsito intestinal; mejora el crecimiento de la mucosa
Bombesina	14			Estimula la secreción pancreática y la liberación de gastrina

Tabla 30-3. Prueba de estimulación con pentagastrina.

	Secreción ácida basal (SAB) (mmol/hora)	Secreción ácida máxima (SAM) (mmol/hora)
Hombres adultos normales		
Menores de 30 años	2.2 – 2.7	14 – 42
Mayores de 30 años	2.2 – 2.7	3 – 33
Mujeres adultas normales	1 – 1.5	7 – 20
Síndrome de Zollinger-	10 – 100 (o más)	40% - 60% por



Ellison		encima de la SAB
Predisposición a las úlceras		
Probable		> 35
Muy probable		> 45
Bajo riesgo		< 11

Tabla 30-4. Prueba de Schilling.

B₁₂ fijada al factor intrínseco	Absorción de vitamina B₁₂ no fijada	Absorción de vitamina fijada/no grupo fijada	Relación
Normal	> 15%	> 15%	0.5 – 1.5
Grupo con lesiones gástricas	> 10%	< 5%	> 2
Anemia perniciosa			
Gastrectomía			
Ausencia congénita de factor intrínseco funcional			
Desórdenes del íleon terminal (ver el texto)	< 15%	< 15%	0.5

Tabla 30-5. Alteraciones bioquímicas y pruebas funcionales en estados patológicos.

Enfermedad: Estearrea		Enfermedad: Enfermedad celíaca	
Grasa en heces:	↑↑	Grasa en heces:	N, ↑
Intolerancia a la lactosa:	N	Intolerancia a la lactosa:	N
Caroteno-S		Caroteno-S	
Vitamina A-S:	↓	Vitamina A-S:	N, ↓
Vitamina B₁₂-S		Vitamina B₁₂-S	
Folato-S:	N, ↓	Folato-S:	N
Prueba de Schilling:	AB	Prueba de Schilling:	N, AB
Absorción de D-xilosa:	AB	Absorción de D-xilosa:	N, AB
Sangre oculta de las heces:	Neg	Sangre oculta de las heces:	Neg
Antígeno carcinoembrionario:	N	Antígeno carcinoembrionario:	N
5-HIAA:	N	5-HIAA:	N
Pruebas de enzimas pancreáticas:	AB	Pruebas de enzimas pancreáticas:	N



Examen		Examen	
Fecal:	Fétidas, grasosas	Fecal:	Variable
Enfermedad: Intolerancia a la lactosa		Enfermedad: Síndrome Carcinoide	
Grasa en heces:	N	Grasa en heces:	N
Intolerancia a la lactosa:	AB	Intolerancia a la lactosa:	N
Caroteno-S		Caroteno-S	
Vitamina A-S:	N	Vitamina A-S:	N
Vitamina B ₁₂ -S		Vitamina B ₁₂ -S	
Folato-S:	N	Folato-S:	N, ↓
Prueba de		Prueba de	
Schilling:	N	Schilling:	N, AB
Absorción		Absorción	
de D-xilosa:	N	de D-xilosa:	N
Sangre oculta		Sangre oculta	
de las heces:	Neg	de las heces:	Neg, pos
Antígeno		Antígeno	
carcinoem-		carcinoem-	
brionario:	N	brionario:	N, ↑
5-HIA:	N	5-HIA:	↑↑
Pruebas de		Pruebas de	
enzimas		enzimas	
pancreáticas:	N	pancreáticas:	N
Examen		Examen	
Fecal:	Diarréicas, asociadas con cólicos abdominales	Fecal:	Diarréicas, asociadas con rubor cutáneo
Enfermedad: Diarrea funcional		Enfermedad: Carcinoma Intestinal	
Grasa en heces:	N	Grasa en heces:	N
Intolerancia a la lactosa:	N	Intolerancia a la lactosa:	N
Caroteno-S		Caroteno-S	
Vitamina A-S:	N	Vitamina A-S:	N
Vitamina B ₁₂ -S		Vitamina B ₁₂ -S	
Folato-S:	N	Folato-S:	N, 9
Prueba de		Prueba de	
Schilling:	N	Schilling:	N
Absorción		Absorción	
de D-xilosa:	N	de D-xilosa:	N
Sangre oculta		Sangre oculta	
de las heces:	Neg	de las heces:	Neg o pos
Antígeno		Antígeno	
carcinoem-		carcinoem-	
brionario:	N	brionario:	N, ↑
5-HIA:	N	5-HIA:	N
Pruebas de		Pruebas de	
enzimas		enzimas	
pancreáticas:	N	pancreáticas:	N
Examen		Examen	
Fecal:	Diarréicas	Fecal:	Alteraciones de los hábitos intestinales
Enfermedad:		Inflamación Intestinal	

Grasa en heces:	N
Intolerancia a la lactosa:	N
Caroteno-S	
Vitamina A-S:	N
Vitamina B ₁₂ -S	
Folato-S:	N, ↓
Prueba de Schilling:	N
Absorción de D-xilosa:	N
Sangre oculta de las heces:	Pos
Antígeno carcinoembrionario:	N, ↓
5-HIAA:	N
Pruebas de enzimas pancreáticas:	N
Examen Fecal:	Diarréicas, sanguinolentas

AB, anormal; N, normal (dentro del intervalo de referencia); S, suero;
↑, elevado; ↓, disminuido.

Figuras

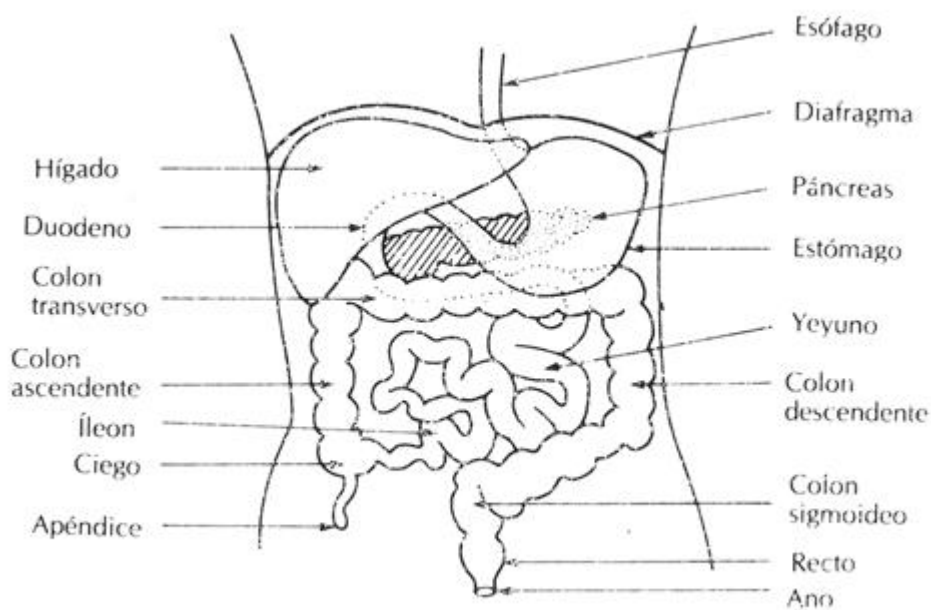


Figura 30-1 Diagrama del tracto gastrointestinal.

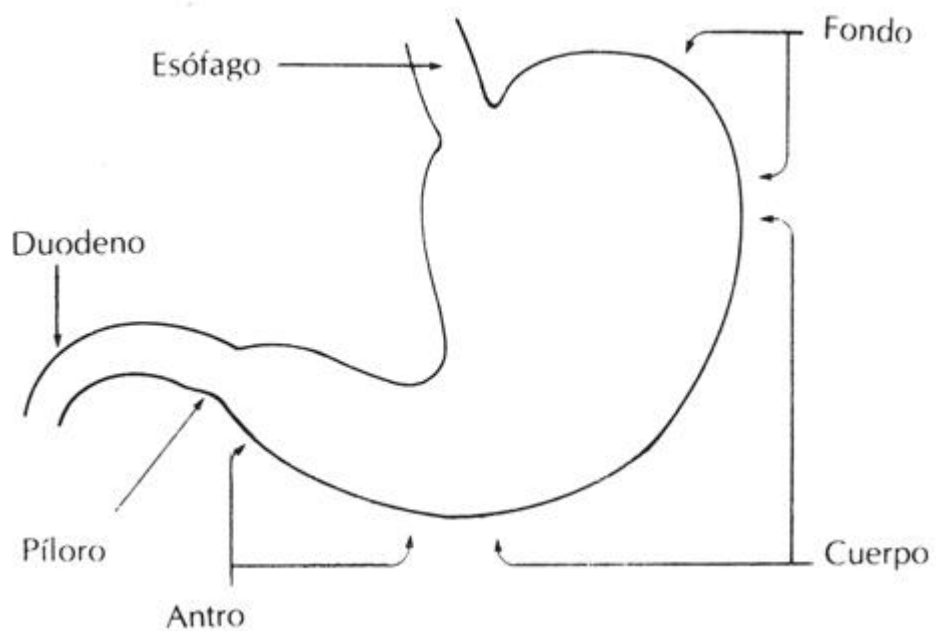


Figura 30-2 Diagrama del estómago.

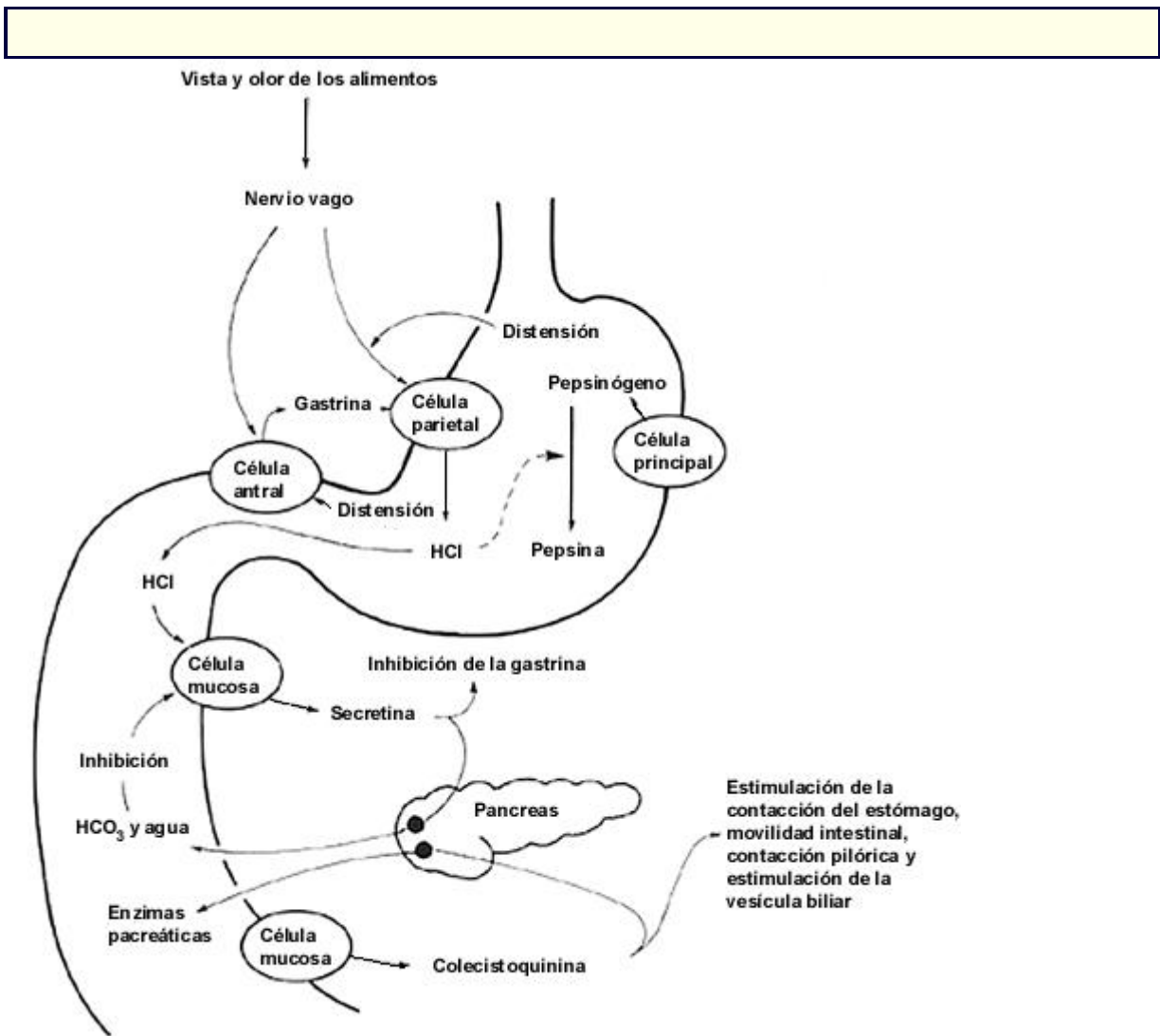


Figura 30-3 Esquema que ilustra diversos estímulos de las funciones gástrica y duodenal

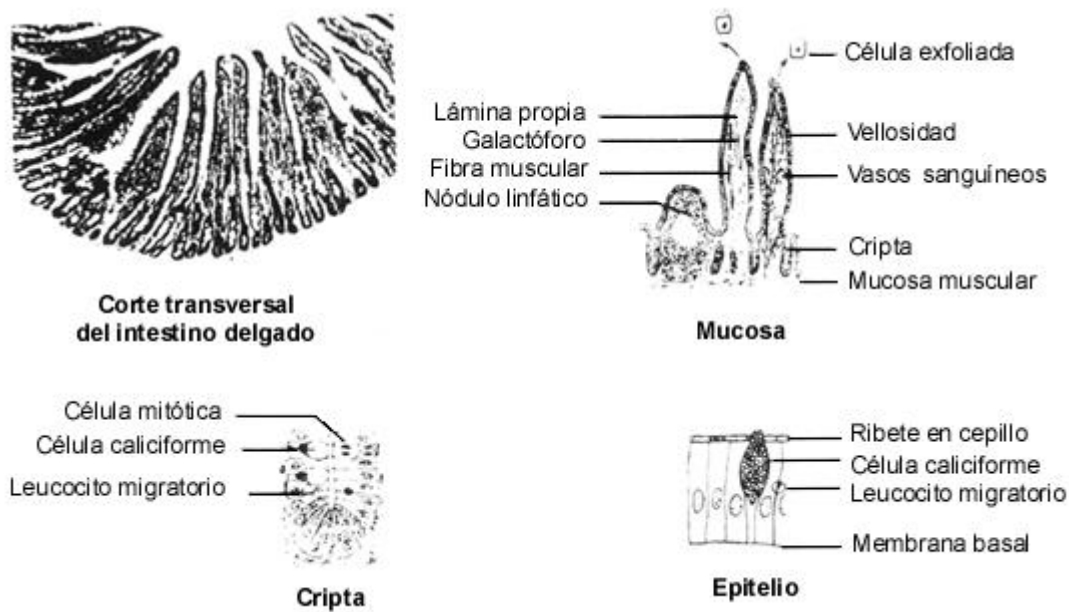


Figura 30-4 Estructuras de los componentes funcionales del intestino delgado. (De: Arey, LB: *Human Histology: a textbook in outline form*. 4^a ed., Filadelfia, 1974, Saunders.)

CAPÍTULO 31

31. Enfermedad Cardíaca y Muscular

John F. Chapman

Robert H. Christenson

Lawrence M. Silverman

Anatomía y función

Músculo

Acetilcolina como transmisor neuromuscular

Anatomía y función del corazón

Bioquímica del músculo y del miocardio

Metabolismo energético

Mioglobina



Demanda energética de los diferentes tipos de músculos

Las enzimas en las células miocárdicas

Proteínas contráctiles

Condiciones patológicas

Trastornos miocárdicos

Trastornos del músculo esquelético

Pruebas funcionales

Terapia con fármacos

Glucósidos

Lidocaína

Quinidina y otros fármacos

Cambio de compuestos analizados en la enfermedad

Mioglobina

Las enzimas y las isoenzimas en el infarto agudo del miocardio

Uso diagnóstico de la troponina T e I y de las cadenas ligeras de miosina

Uso de los marcadores bioquímicos en el manejo de pacientes con dolor precordial

Métodos de análisis

Creatina cinasa

Isoenzimas de Creatina cinasa

Digoxina y digitoxina

Lactato Deshidrogenasa

Enzimas de la lactato deshidrogenasa

Procaïn amida y N-acetilprocaïn amida

OBJETIVOS

Describir brevemente el metabolismo energético miocárdico y las proteínas más importantes involucradas en la función y el metabolismo de las células.

Enumerar las proteínas y las enzimas (y sus isoformas e isoenzimas) que se miden sistemáticamente en el suero para evaluar una enfermedad cardíaca, y establecer los períodos de tiempo para las elevaciones enzimáticas esperadas después de un infarto al miocardio.

Términos Claves

actina Una de las proteínas involucradas en la contracción del miocardio y la musculatura lisa de la pared arterial.

aterosclerosis “Endurecimiento de las arterias”. Un proceso que resulta del depósito gradual de lípidos, fibrina y calcio en las paredes de las arterias. Es la causa más común de muerte en los países occidentales.

aurícula La cámara del corazón que recoge la sangre de las venas y se contrae para expeler la sangre hacia uno de los dos ventrículos. Existen dos aurículas: la derecha recoge la sangre de la circulación sistémica y llena el ventrículo derecho; la izquierda recoge la sangre de las venas pulmonares y llena el ventrículo izquierdo.

cardiomiopatía Un grupo heterogéneo de trastornos con un común denominador de lesión, adquirida o genética, que afecta directamente la contracción de las células miocárdicas.

ciclo de Krebs del ácido cítrico El ciclo del metabolismo intermedio que toma los productos metabólicos de la vía Embden-Meyerhof y los reduce, descarboxila, y oxida para producir trifosfato de adenosina (ATP) en cantidades relativamente grandes.

ciclo Embden-Meyerhof Proceso de glucólisis anaeróbica que convertirá la glucosa o glucógeno en lactato.

émbolo Una porción de un coágulo sanguíneo que se desprende del coágulo principal y viaja a través de la circulación para fijarse en los pulmones (émbolo pulmonar) o en una de las arterias sistémicas (embolia sistémica), según el sitio de origen.

glucósido Un término genérico para un grupo de fármacos, originalmente obtenidas de la planta dedalera. Estos fármacos mejoran la contractilidad del corazón que presenta insuficiencia y reducen la frecuencia de la sístole ventricular en casos de fibrilación auricular. La digoxina es un miembro de esta familia de fármacos.

infarto Lesión tisular producida por la disminución del suministro de sangre. Por lo tanto, el infarto al miocardio o ataque al corazón ocurre cuando una de las arterias coronarias es obstruida y el tejido que es irrigado después de la oclusión muere.

insuficiencia cardíaca Insuficiencia del corazón para mantener la circulación de la sangre, con la resultante retención hidroelectrolítica y la perfusión inadecuada de órganos vitales.

isquemia Una disminución en el flujo de sangre a los tejidos, que es suficiente para alterar la función normal de los mismos.

miosina Es una de las proteínas contráctiles que intervienen en la contracción del músculo cardíaco y de la musculatura lisa de la pared arterial.

talio 201 Un isótopo que puede inyectarse intravenosamente para delinear parte de la masa ventricular isquémica o una cicatriz causada por un infarto antiguo.

tecnecio 99m (99mTc) Un isótopo que puede inyectarse intravenosamente para medir el gasto del ventrículo izquierdo o para detectar un infarto agudo al miocardio (m quiere decir metaestable).

troponina Proteína componente de los filamentos delgados que, junto con la tropomiosina, regula las interacciones entre la actina y la miosina.

ventrículos Las principales cámaras del corazón que bombean la sangre hacia la arteria pulmonar y la aorta. El ventrículo izquierdo es más sólido y vigoroso que el ventrículo derecho debido que la presión en la circulación sistémica es mayor que en la circulación pulmonar; por lo tanto se requiere una bomba más potente para el lado de la circulación general o sistémica.

Anatomía y Función

Músculo

Anatomía

Existen tres grupos distintos de músculos: esqueléticos; cardíacos y de fibra lisa. El *músculo esquelético* consiste en haces paralelos de células musculares cilíndricas no ramificadas, o miotúbulos, y fibras multinucleadas que son el resultado de la fusión de muchas células durante el proceso de la miogénesis. Las fibras recorren la longitud total del músculo y



poseen un bandeo cruzado visible al microscopio, que tiene terminales nerviosas bien definidas y están bajo control voluntario. Las contracciones las inician los impulsos nerviosos denominados *neurogénicos*.

En cada célula muscular existe un haz de *miofibrillas* cilíndricas, que están rodeadas por una extensa red de canales tubulares, el *retículo sarcoplásmico*. Las *terminaciones nerviosas* están unidas a la superficie externa del sarcolema a través de la placa motora terminal de un axón. El *sarcoplasma* o líquido intracelular muscular baña las fibrillas contenidas por el sarcolema. El material contráctil de las miofibrillas está organizado en unidades repetidas, llamadas *sarcómeros*. Dicho material contráctil está compuesto por las proteínas *miosina* y *actina* que se alternan en forma de filamentos en cada sarcómero. Las proteínas encontradas en la estructura de las miofibrillas se muestran en la Tabla 31-1.

El *músculo cardíaco* únicamente se encuentra en el corazón. Es similar en estructura al músculo esquelético excepto que las células están ramificadas e interconectadas. No existen placas terminales definidas en el músculo cardíaco, y en condiciones normales no está bajo control voluntario; es decir no requiere que los nervios inicien y mantengan su contracción y por lo tanto se denomina *miogénico*.

El *músculo de fibra lisa* está compuesto por células fusiformes estrechas con un solo núcleo. La célula del músculo de fibra lisa no tiene una placa terminal estructuralmente definida y no está bajo control voluntario; por lo tanto, también se le denomina músculo *involuntario*. El músculo de fibra lisa se encuentra usualmente en las paredes de los tubos o sacos tales como los vasos sanguíneos, las paredes del útero, la vejiga urinaria, los intestinos, y los bronquiolos. Se caracteriza por contracción lenta, y puede mantener la tensión o una longitud dada sin fatiga y con un bajo costo de energía.

Funciones y mecanismo

La función general de los músculos es una respuesta mecánica a la estimulación que produce contracción y desarrollo de fuerza de manera simultánea. El músculo esquelético modifica sus funciones por un sistema de palancas como resultado de su fijación a los huesos. En el músculo cardíaco la fuerza se manifiesta al desarrollarse presión dentro de las cavidades cardíacas durante la fase de sístole (acortamiento muscular), lo cual produce una reducción en el tamaño de las cámaras (ventrículos).

La contracción muscular lisa es observada cuando los órganos o cavidades de musculatura lisa se vacían, como en el caso del vaciado de la vejiga o la expulsión de un feto del útero. Es aparente que se desarrolla de una fuerza considerable durante esta actividad de la musculatura lisa.

La energía para la contracción muscular inmediata la suministra la hidrólisis del trifosfato de adenosina (ATP). Esta cantidad de ATP hidrolizada para la contracción no es constante sino que depende de la duración de la misma y de la cantidad de trabajo realizado por los músculos. Los sitios donde ocurre la hidrólisis de ATP están en los puentes cruzados formados entre los elementos responsables de la interacción de la miosina y de la actina del sarcómero, y la adenosintrifosfatasa, ATPasa, que es sumamente activa únicamente cuando interactúan la miosina y la actina.

La relajación del músculo es un proceso pasivo; cuando cesa la hidrólisis de ATP en el complejo actina-miosina, del sarcómero, él mismo regresa a su posición de descanso. Los filamentos entrecruzados retornan por deslizamiento a una nueva posición, menos



sobrepuesta, aumentando por ende la longitud del músculo. El mismo principio básico se aplica al músculo esquelético y cardíaco e inclusive a la contracción del músculo de fibra lisa.

Acetilcolina como transmisor neuromuscular

Las terminaciones nerviosas motoras difieren, dependiendo del principal tipo de fibra. Las fibras de “contracción espasmódica lenta”, que responden a estímulos nerviosos con contracciones prolongadas, están por lo general inervadas por múltiples terminaciones nerviosas. Las fibras de “contracción espasmódica rápida” son generalmente inervadas por placas terminales individuales. En ambos tipos de terminaciones nerviosas motoras la acetilcolina es sintetizada y almacenada en vesículas. La acetilcolina, que funciona como neurotransmisor, es liberada de la terminación nerviosa y se une a los receptores en el sarcolema, despolarizando la membrana plasmática muscular e iniciando los procesos bioquímicos que dan como resultado la contracción muscular. Estos eventos incluyen la participación de iones Ca^{++} como un segundo mensajero, activación de la ATPasa en el complejo de troponina y la activación de la interacción entre la actina y miosina

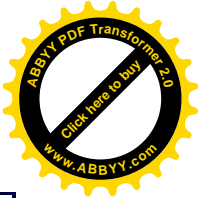
Anatomía y función del corazón

La acción de bombeo del corazón^{ref(974)} es el principal factor para mantener la circulación del organismo. El corazón es un órgano muscular compuesto por cuatro cámaras, las dos aurículas y los dos ventrículos. Las aurículas recogen la sangre de la circulación general y la llevan a los ventrículos. El ventrículo derecho bombea la sangre a los pulmones para su reoxigenación y el ventrículo izquierdo bombea la sangre al resto del organismo, incluyendo al corazón mismo. El gasto cardíaco está determinado principalmente por la frecuencia de contracciones cardíacas, la presión arterial sistémica, y la fuerza contráctil desarrollada en la pared del ventrículo izquierdo. El músculo cardíaco, que es altamente activo, requiere grandes cantidades de oxígeno para su metabolismo. El suministro del oxígeno necesario para abastecer al corazón requiere de un rico lecho capilar. En condiciones normales, aproximadamente el 75% del oxígeno de la sangre que pasa a través del corazón es extraído y los cambios en la demanda metabólica, particularmente los cambios de frecuencia cardíaca, se efectúan mediante modificaciones en el flujo coronario.

Bioquímica del Músculo y Miocárdica

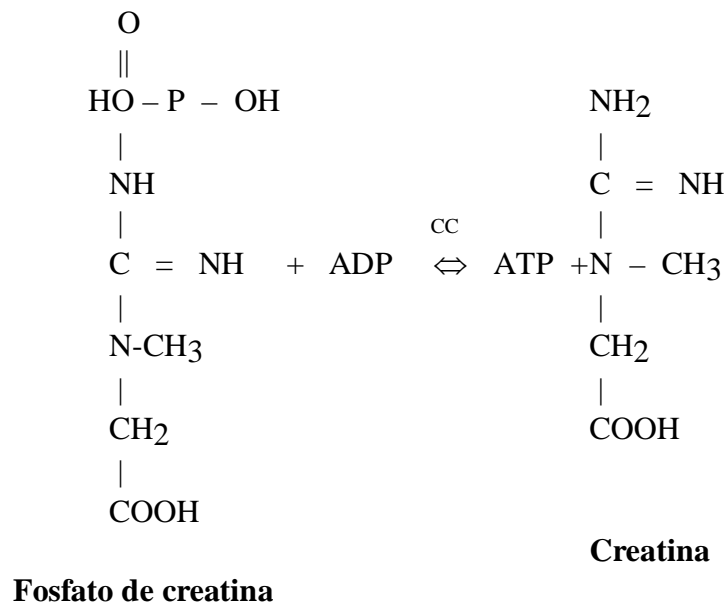
Metabolismo energético

Varios substratos son usados por las células musculares como combustible. La energía es liberada de estos combustibles por varias vías, incluyendo la vía glucolítica de Embden-Meyerhof, la desviación del ciclo de fosfatos de pentosa, la oxidación de ácidos grasos, y el ciclo de Krebs del ácido cítrico (ver capítulo 32). La energía producida por la degradación de los substratos es entonces conducida a través del sistema transportador de electrones de las mitocondrias para producir trifosfato de adenosina, la forma química de energía almacenada que es usada por el tejido muscular para realizar el trabajo. Para realizar su función las células musculares deben mantener una alta proporción de ATP/ADP, y todos los músculos requieren un método de almacenamiento efectivo para mantener una reserva de ATP. Esto se logra mediante la síntesis del fosfato de creatina (FC), el cual actúa como una



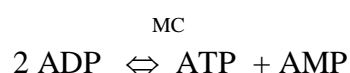
reserva de almacenamiento que puede ser usada para la rápida regeneración de ATP cuando los niveles disminuyen como resultado de un aumento de la demanda.

Este gran reservorio de energía usa las enzimas creatina cinasa, CC, y miocinasa, MC (o CK y MK por su abreviatura en inglés) para mantener una concentración equilibrada de ATP, ADP y FC. El efecto inmediato del aumento en las concentraciones de ADP causado por la hidrólisis de ATP durante la contracción es una alteración en el equilibrio de la reacción catalizada por la creatina cinasa:



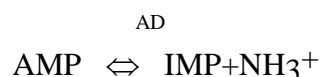
El equilibrio es restablecido mediante la fosforilación del ADP a ATP a través de esta reacción, manteniendo por lo tanto una alta proporción de [ATP]/[ADP].

Otra enzima, la *miocinasa*, cataliza la reacción:



Esta reacción también garantiza el restablecimiento de la alta proporción original de [ATP]/[ADP].

Una tercera enzima presente en el músculo, la *deaminasa de adenosina* (AD), evita la acumulación del AMP producido por la reacción de la miocinasa mediante la desaminación del AMP:



Entonces el monofosfato de inosina (IMP) o bien regresa al reservorio de nucleósidos como inosina o es degradado hasta ácido úrico. Para una contracción simple (contracción espasmódica) o para cortos períodos de actividad muscular, el único cambio que puede ser medido en el reservorio de fosfatos de alta energía es un pequeño cambio en el fosfato de



creatina.

Mioglobina

La dependencia de oxígeno del corazón es crítica, ya que consume entre 6.5 y 10 mL/100 g de tejido por minuto en reposo. Existe un abrupto incremento en los requerimientos de oxígeno durante el ejercicio. Normalmente, alrededor del 70% del oxígeno que llega al corazón es extraído por la *mioglobina*, una hemoproteína globular de cadena simple. Todas las células musculares contienen mioglobina; el miocardio contiene 1.4 mg de mioglobina por gramo de tejido. La curva de disociación del oxígeno de la mioglobina es diferente a la de la hemoglobina y por ende facilita la entrada del oxígeno a todas las células musculares, proporciona almacenamiento local para el oxígeno, y es esencial para el mantenimiento de la función cardíaca. La mioglobina, con un peso molecular de 17,000 daltones, es lo suficientemente pequeña como para ser filtrada libremente por los glomérulos y es excretada en la orina.

Requisitos energéticos de los diferentes tipos de músculos

Esquelético.

El músculo esquelético humano contiene tanto fibras rojas como blancas, las cuales difieren en sus propiedades metabólicas. Las fibras rojas o lentas, son ricas en mioglobina y mitocondrias. En estas fibras la principal vía metabólica es la fosforilación oxidativa. Las fibras blancas o rápidas contienen poca mioglobina y mitocondrias, y la principal ruta para el metabolismo energético es la glucólisis.

En máxima actividad, el músculo esquelético puede aumentar su absorción de oxígeno veinte veces o más durante la transición a partir del descanso hasta la actividad total, a fin de suministrar el oxígeno necesario para el proceso oxidante.

No obstante, en máxima actividad los músculos esqueléticos aún son relativamente pobres en oxígeno (anóxicos) y el lactato, producto final del metabolismo anaeróbico, aumenta en la sangre.

La *acidosis* ocurre cuando los procesos metabólicos u otros procesos anormales producen un pH inferior al normal de la sangre arterial. La acidosis láctica, que resulta de una producción excesiva de ácido láctico, puede ocurrir en los músculos esqueléticos normales después del ejercicio excesivo. La acidosis localizada en el músculo esquelético contribuye a la fatiga y puede resultar en un calambre y dolor muscular, especialmente cuando está acompañado de una pérdida excesiva de cloruro de sodio.

Cardíaco.

El metabolismo altamente anaeróbico del corazón le permite usar como combustible muchos sustratos normalmente presentes en el plasma, y la absorción cardíaca de la mayoría de estos sustratos es proporcional a su concentración arterial una vez que ciertos niveles son excedidos. En términos generales, el corazón usa los ácidos grasos libres como su combustible predominante. También consume importantes cantidades de glucosa y lactato, así como cantidades más pequeñas de piruvato, cuerpos cetónicos, y aminoácidos. La mayor parte de la energía para la función cardíaca se obtiene de la descomposición de metabolitos a

través del ciclo del ácido cítrico y la fosforilación oxidativa. Estas vías enzimáticas se encuentran principalmente en las mitocondrias, representando aproximadamente un 35% del volumen total del músculo cardíaco.

Enzimas en las células miocárdicas

Varias enzimas encontradas en el tejido^{ref(975)} miocárdico son clínicamente importantes debido a que su liberación en el torrente sanguíneo puede estar relacionada con el daño y la muerte de las células miocárdicas. Las enzimas que se miden sistemáticamente en el laboratorio clínico para la determinación de la enfermedad miocárdica se discuten adelante.

Creatina cinasa.

La enzima responsable de la regeneración del ATP es la creatina cinasa.^{ref(976)} Tiene un peso molecular de 85,000 daltones y existe en diversas formas isoenzimáticas (ver el siguiente texto y el capítulo 55). La creatina cinasa (CC) es un dímero, compuesto de las dos subunidades M (músculo) y B (cerebro). Las tres isoenzimas formadas a partir de estas subunidades se encuentran en el “citósol”. Estas isoenzimas se abrevian como MM, MB, y BB. Si comparamos la actividad de la enzima en varios tejidos, el músculo esquelético tiene por mucho la mayor actividad, poseyendo unas 50,000 veces la concentración de la CC sérica. La isoenzima esquelética predominante es la isoenzima MM, con sólo trazas de las isoenzimas MB y BB en la mayoría de las fibras musculares. El componente MB, sin embargo, está incrementado en ciertos trastornos musculares, particularmente en la distrofia muscular tipo Duchenne y en la polimiositis. La actividad de CC del músculo esquelético medida en unidades internacionales es aproximadamente de 2000 U/g, comparada con la actividad del músculo cardíaco de 500 U/g. En suero normal, por lo menos el 95% de la CC presente es del tipo MM y probablemente es debido principalmente a fugas del músculo esquelético, particularmente durante la actividad física. Debido a esto, la actividad de la CC sérica en personas activas saludables muestra una distribución asimétrica inclinada hacia valores más altos. Además, los valores son más bajos en las mujeres que en los hombres y son más bajos en la mañana que en la noche. Los valores tienden a ser más bajos en pacientes hospitalizados, posiblemente debido a que el reposo en cama reduce la cantidad de enzimas liberadas del músculo.

Isoformas de CC^{ref(977)}

Las isoenzimas CC-MM y CC-MB en suero pueden ser fraccionadas en subtipos o “isoformas”, mediante técnicas de alta resolución tales como electroforesis de alto voltaje o enfoque isoelectrico. Las isoformas de CC-MM y CC-MB se forman en la sangre mediante la ruptura enzimática irreversible del aminoácido del COOH terminal, un residuo de lisina, de la subunidad M o de las subunidades de las isoenzimas del tejido. Para la CC-MM, esta ruptura involucra la remoción sucesiva de los residuos terminales de lisina de *cada* subunidad M, dando lugar a tres isoformas llamadas MM₃ (forma tisular, o M_{lisina} M_{lisina}), MM₂ (o M_{lisina}M), y MM₁ (o MM). La CC-MB, que tiene una sola subunidad M, consiste de dos isoformas en la circulación, la llamada MB₂ (forma de tejido, o M_{lisina}B), y MB₁ (o MB). Es de notar que la secuencia amino terminal de la subunidad B de la CC es similar al de la subunidad M, sin embargo, la ruptura de la lisina terminal de la subunidad B de la CC-MB



permanece controversial.

Lactato deshidrogenasa.

La lactato deshidrogenasa (LD)^{ref(978)} [ref errónea] (ver adelante y en el capítulo 55) es una enzima tisular ubicua que cataliza la reducción de piruvato a lactato usando nicotinamida adenina dinucleótido (NAD). La LD tiene un peso molecular de aproximadamente 140,000 daltones y es un tetrámero compuesto de cuatro subunidades con peso molecular de 35,000 daltones cada una. Las subunidades, que son de dos formas, H (corazón) y M (músculo), se combinan para formar las cinco isoenzimas de LD. La principal isoenzima (HHHH) tiene una actividad máxima en presencia de bajas concentraciones de piruvato pero se inhibe por exceso de piruvato. Por contraste, la principal isoenzima muscular (MMMM) exhibe actividad máxima en presencia de una mayor concentración de piruvato y se inhibe menos por exceso de piruvato. El corazón metaboliza los ácidos grasos y los carbohidratos a una velocidad aproximadamente constante con oxidación completa del piruvato a través del ciclo de Krebs del ácido cítrico. Por lo tanto el corazón tiene una baja concentración tisular de piruvato y lactato y rápidamente convierte el lactato del plasma en piruvato. Por contraste, el músculo, con rápidas demandas de incrementos de energía durante el ejercicio, tiene que contender con rápidos incrementos en piruvato y lactato de tejido causados por el metabolismo anaeróbico (ver capítulo 32).

La LD se encuentra en el citosol de todas las células humanas y por lo tanto tendría poca especificidad para el diagnóstico a no ser por el hecho de que las isoenzimas están presentes en diferentes proporciones en cada tejido (capítulo 55). El corazón y los eritrocitos contienen principalmente LD₁ y LD₂, mientras que el músculo esquelético y el hígado contienen LD₅ y en menor grado LD₄. El suero normal contiene principalmente LD₂, con menores cantidades de LD₁ y de las otras isoenzimas. Si las enzimas son liberadas del tejido cardíaco al suero, a menudo vemos un cambio en la proporción de LD₁ a LD₂. La vida media de la LD es diferente para cada isoenzima; la isoenzima 1, (HHHH), tiene una vida media de aproximadamente 100 horas, mientras que la isoenzima 5 (MMMM) tiene una vida media de sólo 10 horas. La importancia de esto es evidente en la discusión de la liberación de las enzimas durante el infarto al miocardio.

Aspartato aminotransferasa.

La aspartato aminotransferasa (ASAT)^{ref(979)} [ref errónea] cataliza la transferencia de un grupo amino entre el ácido aspártico y el piruvato para formar oxaloacetato (alfa cetoglutarato) y alanina. Esta enzima ubicua es esencial en el metabolismo intermedio y permite que los aminoácidos ácido aspártico y ácido glutámico se degraden en el ciclo de Krebs. La enzima existe en dos formas estructuralmente diferentes; una se encuentra principalmente en el citoplasma y la otra en las mitocondrias. La forma citosólica es la que se encuentra en el suero. Su vida media en el suero es probablemente de alrededor de 20 horas. El hígado tiene la mayor actividad enzimática, con aproximadamente 85 U/g de tejido, mientras que el corazón posee 75 U/g y el músculo esquelético cerca de 50 U/g.

Aldolasa.

La aldolasa es una enzima del grupo de las liasas. Su efecto es la ruptura reversible de



su substrato en dos compuestos sin hidrólisis. La siguiente reacción es catalizada por la aldolasa (ALD):

ALD

Fructosa-1, 6-difosfato \rightleftharpoons Fosfato de dihidroxiacetona + Gliceraldehído-3-fosfato

La aldolasa es una enzima importante en la vía glucolítica y se encuentra en toda célula viviente. En los tejidos en que la glucólisis suministra una gran parte de la energía requerida, se puede encontrar gran actividad de aldolasa. Por ejemplo, cerca de 300 mg de músculo esquelético contienen tanta aldolasa como la que se encuentra en el volumen normal de sangre circulante. Las fructosa difosfato aldolasas están presentes en diferentes formas de isoenzimas. Las tres principales formas son aldolasa A, predominantemente en los músculos; aldolasa B, en el hígado; y aldolasa C, en el cerebro. Las tres aldolasas contienen cuatro subunidades de polipéptidos que difieren en su composición de aminoácidos.

Proteínas contráctiles^{ref(980)} [ref?] (Tabla 31-1)

Los marcadores bioquímicos más comúnmente usados para lesión del miocardio están involucrados con el metabolismo de las células, son solubles, y están localizados en el compartimento citosólico de las células. Debido a estas propiedades, una gran proporción de estos marcadores citosólicos son liberados rápidamente en la circulación después de una lesión celular. Por contraste, la naturaleza y función de las proteínas estructurales determina que sean solubles; por consiguiente una proporción relativamente pequeña está libre en el citosol y disponible para su rápida liberación poco después de una lesión celular. A esta pequeña proporción disponible para liberación se le denomina el “reservorio citosólico”.

A pesar de la desventaja teórica de su insolubilidad, se ha generado bastante interés en las siguientes proteínas estructurales: troponina I, troponina T, y las cadenas ligeras de miosina. La base de este interés clínico surge de la identificación y purificación de formas cardíacas de estas proteínas con alta especificidad tisular, que se discuten adelante con mayor detalle, han permitido el desarrollo de ensayos inmunológicos para la determinación de lesiones miocárdicas.

Miosina, actina y troponina.

Las proteínas miosina y actina forman la mayor parte del aparato contráctil de las células musculares. Juntas constituyen el 80% de la proteína de las células musculares (ver la Tabla 31-1). Las proteínas reguladoras troponina y tropomiosina, en asociación con la actina polimerizada, forma los filamentos delgados del sarcómero. La troponina consiste de un complejo de tres subunidades: troponina C, troponina I, y troponina T.

Troponina T (TnT)^{ref(981)}

La proteína troponina T, de 37 kilodaltones, tiene un reservorio citosólico que constituye cerca del 6% de su concentración intracelular total. A pesar de encontrarse tanto en el tejido esquelético como en el corazón, la TnT está siendo usada exitosamente como un marcador para la enfermedad cardíaca isquémica debido a que un subtipo encontrado en el tejido miocárdico tiene una homología de solamente 60% con la forma del músculo esquelético. Se han desarrollado anticuerpos altamente específicos que discriminan entre los

subtipos de los músculos cardíacos y esqueléticos.

Troponina I (TnI)^{ref(982)}

Al igual que la TnT, la TnI es parte integrante del aparato contráctil estructural tanto del músculo esquelético como del miocárdico. Se cree que el reservorio citosólico de TnI es el mismo que el de TnT, esto es, cerca del 6% de la concentración total de TnI de las células. La TnI, con un peso molecular de 21 kilodaltones, es ligeramente más pequeña que la TnT. El subtipo cardíaco de la TnI tiene varias regiones de amino ácidos que difieren substancialmente de la forma del músculo esquelético. Estas regiones sirven como base para los inmunoensayos cardíacos específicos.

Cadenas ligeras de Miosina (CLMs)^{ref(983)}

La miosina es una molécula de filamentos largos (540 kD) compuesta por seis cadenas de péptidos, dos de las cuales son pesadas (230 kD) y cuatro son ligeras (CLMs), con pesos moleculares en el rango de 26 kD. Las CLMs están formadas por dos componentes, la cadena ligera de miosina-1 y la cadena ligera de miosina-2, que juntas constituyen el filamento grueso del aparato contráctil en el músculo esquelético y miocárdico. Las CLMs de fuentes cardíacas y no cardíacas pueden ser diferenciadas usando anticuerpos específicos para CLMs cardíacas.^{ref(984)} Debe notarse que el reservorio citosólico para las CLMs es de 0.5% de la cantidad total de células, y solamente cerca del 10% del reservorio citosólico para TnT o TnI.

Condiciones Patológicas

Trastornos miocárdicos

Los procesos patológicos que afectan al corazón generalmente son clasificados en una de las cuatro categorías generales enumeradas a continuación:

1. Enfermedad cardíaca isquémica
2. Cardiomiopatía
3. Arritmias
4. Enfermedad cardíaca congénita y valvular.

Enfermedad cardíaca isquémica.

La isquemia^{ref(985)} es una condición en la cual un órgano tiene un suministro sanguíneo que es inadecuado para mantener sus funciones esenciales. Existen muchas causas de isquemia miocárdica, pero la causa más común es la aterosclerosis coronaria. Esta condición puede desarrollarse durante años, algunas veces comenzando inclusive en la niñez, a medida que las arterias que suministran sangre al corazón se estrechan gradualmente debido al depósito de colesterol y otros materiales en las paredes de las arterias (ver capítulo 33). El vasoespasma coronario también puede producir isquemia. En el vasoespasma coronario la pared arterial se estrecha en una forma anormal y prolongada debido a la supersensibilidad a señales vasoconstrictoras normales. Otras causas menos comunes de isquemia miocárdica son la inflamación de las arterias coronarias, la trombosis (coágulos sanguíneos), la anemia grave, y la hipotensión grave.

Efectos de la oclusión en el miocardio.

El cese de flujo sanguíneo produce una compleja serie de consecuencias. No sólo

existe una seria hipoxia debido a que la concentración de oxígeno en el tejido baja drásticamente, sino que también existe el problema de eliminar los metabolitos celulares tóxicos del tejido isquémico y la producción de radicales libres después de la reperusión de los tejidos dañados. La oclusión repentina de la arteria coronaria deja a las células miocárdicas con solamente pocos segundos de metabolismo aeróbico ya que ellas consumen rápidamente los suministros de oxígeno que permanecen en la microvascularización. Una vez que se ha agotado el suministro de oxígeno, la fosforilación oxidativa de las mitocondrias no puede continuar. Entonces el metabolismo miocárdico cambia al uso de glucógeno o glucosa en la vía anaeróbica de Embden-Meyerhof, en vez del ciclo aeróbico de Krebs. Puesto que el ciclo de Krebs no puede funcionar, el producto final del metabolismo anaeróbico de la glucosa, el piruvato, es reducido a lactato, y la acumulación de lactato es uno de los primeros y más impresionantes signos de la isquemia miocárdica.

En la medida en que la isquemia progresa, las reservas de fosfato de creatina se agotan, los niveles de trifosfato de adenosina caen, y el tejido cardíaco se torna más ácido conforme el lactato y otros intermediarios ácidos de la glucólisis se acumulan. Hasta 15 o 20 minutos después de un incidente isquémico, el tejido se recuperará si se vuelve a irrigar. No obstante, después de aproximadamente 20 minutos de oclusión, cerca del 60% del trifosfato de adenosina celular ha sido agotado y la cantidad de lactato en el tejido miocárdico húmedo es 12 veces su nivel aeróbico normal. Además, todo el glucógeno celular se ha agotado. Una vez que todas las reservas de glucógeno y de fosfato de creatina han sido usadas, ocurren cambios ultraestructurales ostensibles, indicando daño celular irreversible. También es evidente el daño a la membrana celular. Si en este punto, la obstrucción es relajada y el tejido miocárdico se vuelve a irrigar, éste no puede tolerar la llegada de sangre fresca y se desarrolla lisis y contractura celular.

El punto en el que la lesión isquémica reversible se vuelve una lesión isquémica irreversible es el punto en el que la célula ya no es capaz de mantener la integridad de la membrana. El daño a la membrana celular da como resultado la liberación de los contenidos intracelulares. De estos contenidos, lo que es significativamente importante para la evaluación y confirmación de la lesión isquémica irreversible es la liberación de las enzimas y proteínas solubles. La liberación de enzimas refleja daño irreversible a los miocitos e indica que el paciente ha sufrido un infarto al miocardio en vez de una simple angina o un episodio isquémico transitorio. Las moléculas importantes que son liberadas después de una lesión isquémica irreversible son enzimas y proteínas solubles tales como creatina cinasa, aspartato aminotransferasa, lactato deshidrogenasa, aldolasa, miocinasa, alanino aminotransferasa, cadenas ligeras de miosina, troponinas, y mioglobina.

La mayoría de las enzimas liberadas tempranamente en el infarto son citoplásmicas. Las enzimas mitocondriales, si son solubles también son liberadas, pero usualmente existe una demora antes de que aparezcan en el plasma. Una vez que ha ocurrido el daño a la membrana, la velocidad de aparición de una enzima en la circulación parece depender de la velocidad y del grado de reperusión del miocardio dañado, así como del tamaño de la molécula de la enzima. A mayor flujo, mejor reperusión y mientras más pequeña sea la molécula, más pronto aparecerá en la sangre periférica. La CC, con un peso molecular de 85,000 daltones, es liberada antes que la ASAT, con un peso molecular de 120,000 daltones, la cual a su vez es liberada antes que la LD, que tiene un peso molecular de 140,000 daltones.



Cardiomiopatía.[ref\(986\)](#)

La cardiomiopatía representa un grupo diverso de trastornos, que generalmente caen en dos categorías: (1) lesión que se origina en el tejido del corazón y (2) lesión que es secundaria a otros trastornos no miocárdicos. La cardiomiopatía se caracteriza por una contracción muscular inadecuada causada por daño directo a las células del miocardio y típicamente da como resultado una sobrecarga hemodinámica y falla o insuficiencia cardíaca. A pesar de que existen algunas formas específicas de cardiomiopatía, la mayoría de los casos clínicos son idiopáticos; es decir, la causa no es clara. La cardiomiopatía se manifiesta como un agrandamiento de las cuatro cámaras del corazón acompañado de insuficiencia cardíaca. Los hallazgos bioquímicos en la mayoría de los casos de cardiomiopatía no son específicos y reflejan la manifestación clínica principal, esto es, insuficiencia cardíaca. Por lo menos dos formas de esta lesión, la *cardiomiopatía hipertrófica familiar* y la *miocarditis viral*, pueden ser ahora diagnosticadas usando las técnicas de genética molecular.

Arritmias.

A pesar de que la estructura del corazón como bomba es relativamente simple, el sistema neuroregulador que controla el patrón de las contracciones de cada una de sus cuatro cámaras y regula la función cardíaca con relación a las necesidades de los órganos del cuerpo es necesariamente mucho más complejo y por lo tanto, con mayor riesgo de daño.

Los cambios anatómicos que dan por resultado arritmias cardíacas son relativamente inespecíficos y frecuentemente están relacionados con el proceso de la enfermedad que afecta al músculo del corazón. Una causa importante de las arritmias es el infarto al miocardio. Cualquiera que sea la causa del daño, este daño frecuentemente distorsiona la transmisión del impulso nervioso cardíaco, produciendo una actividad contráctil irregular anormal y autosostenida. En términos funcionales las anormalidades rítmicas están clasificadas como bradicardias (que da como resultado velocidades de latidos del corazón inferiores a 60 latidos/min.) o como taquicardias (que producen velocidades de latidos del corazón mayores a 100 latidos/min.). Las arritmias pueden afectar las contracciones auriculares o ventriculares y pueden ser agudas o crónicas. La fibrilación auricular es una anormalidad rítmica bastante común en la que la aurícula late de una forma rápida anormal e irregular. Las arritmias crónicas son controladas mediante fármacos, los niveles de suero de las mismos deben ser monitoreados sistemáticamente.

Anomalías cardíacas congénitas y valvulares.

Muchas de las anormalidades cardíacas congénitas que han sido descritas no son discutidas en este texto. En términos generales, todos los componentes del corazón pueden ser afectados por una falla durante el desarrollo. La mayoría de las causas son desconocidas, pero una excepción importante es la infección de la madre por rubéola durante el primer trimestre del embarazo.

De las enfermedades valvulares adquiridas del corazón, un gran grupo es causado por la carditis reumática. En sujetos susceptibles afectados por el estreptococo hemolítico, el cuerpo desarrolla una reacción inmune contra todo el tejido miocárdico, pero en particular las válvulas, las cuales se dañan y deforman.

Trastornos del músculo esquelético

Todas las enfermedades del músculo están caracterizadas por la disfunción motora, tales como debilidad muscular. La anomalía se encuentra en alguna parte de la unidad motora. La *unidad motora* está compuesta por una sola neurona motora inferior, la célula del cuerno anterior, su raíz eferente, la fibra nerviosa periférica, y su arborización terminal. También incluye la placa terminal motora en la unión neuromuscular junto con las 10 a 600 fibras musculares inervadas por la neurona.

Las tres principales categorías de trastornos musculares, de acuerdo a la parte de la unidad motora afectada, son (1) atrofia muscular neurogénica, (2) trastornos de fibras musculares, y (3) alteraciones de la unión neuromuscular. Dentro de cada clase principal existen más distinciones basadas en los loci, u orígenes conocidos de los defectos. Estas categorías se encuentran enumeradas a continuación:

Las *atrofias musculares* son causadas por una pérdida de inervación eferente como resultado de una degeneración de la célula del cuerno anterior o de un axón a nivel de la raíz eferente anterior o de la célula nerviosa periférica.

Las *miopatías* están caracterizadas por defectos importantes a nivel de la fibra muscular. Ciertas miopatías progresivas hereditarias son llamadas, por convención, *distrofias musculares*. Las *miopatías no hereditarias* pueden resultar de la inflamación o de una anomalía exocrina o metabólica.

Complicaciones de la raíz anterior y del nervio periférico.

La *polineuropatía aguda*, o síndrome de Guillain-Barré, es una enfermedad parainfecciosa y postinfecciosa y se presume es causada por un ataque inmunológico a los nervios periféricos.

Las *neuropatías metabólicas* son consideradas junto con las enfermedades metabólicas tales como la diabetes mellitus o la desnutrición.

Trastornos de fibras musculares: distrofias musculares.

La distrofia muscular es un nombre general para un grupo de enfermedades crónicas del músculo. Las características generales son debilidad progresiva y degeneración del músculo esquelético sin evidencia de degeneración neural. Son enfermedades heredadas con diferentes patrones de herencia. La edad del inicio, el curso de la enfermedad, y el efecto en los diferentes tipos de fibras difieren entre las enfermedades individuales.

Distrofia muscular pseudohipertrofica, o distrofia muscular de Duchenne, es un trastorno recesivo ligado al sexo. Es la más común de las distrofias musculares. Afecta a los varones típicamente entre los 3 y los 7 años de edad con progresión estable de la debilidad muscular proximal, y la mayoría de los pacientes son confinados a sillas de ruedas alrededor de los 10 a los 12 años de edad. Las enzimas del suero están sumamente elevadas en la enfermedad incluso antes de que se desarrollen los síntomas; se observa especialmente el aumento de creatina cinasa. Los valores de creatina cinasa en mujeres heterocigóticas y personas normales se superponen, desafortunadamente sólo en alrededor del 50% al 70% de las mujeres heterocigóticas son identificables positivamente como portadoras de genes. No obstante, el diagnóstico de esta enfermedad mediante el análisis del DNA y asesoría genética han cambiado significativamente la ocurrencia de la enfermedad en los últimos 10 años, lo que es afortunado, dada la gravedad de la enfermedad y de la falta de terapia.

Pruebas Funcionales

Las pruebas más importantes para la determinación de la función cardíaca son el electrocardiograma (ECG)[ref\(987\)](#) y las técnicas de imagen miocárdica.[ref\(988\)](#) El ECG involucra el registro no invasivo de los impulsos eléctricos a través del corazón y es un medio efectivo, más no perfecto, de evaluar las anormalidades del ritmo cardíaco y de diagnosticar un infarto al miocardio. A pesar de ser relativamente específico para el infarto al miocardio, se cree que la sensibilidad del diagnóstico del ECG varía del 43% al 65%. Los datos de un estudio reciente sobre la confiabilidad del diagnóstico del ECG inicial en el departamento de emergencia demostraron que la sensibilidad y la especificidad para el infarto agudo al miocardio son de 79% y de 83% respectivamente.[ref\(989\)](#) Las técnicas de imágenes miocárdicas (pírofosfato de tecnecio-99m y talio 201) son usadas para evaluar las anormalidades en el gasto cardíaco y de la motilidad de las paredes del corazón, y para detectar regiones del miocardio que no estén funcionando debido al infarto. La sensibilidad del diagnóstico mediante la exploración con pírofosfato de tecnecio-99m llegar a ser hasta de 84% en infartos transmurales; sin embargo, la sensibilidad puede ser tan baja como el 32% en pacientes con infartos no transmurales. La exploración con talio-201 no se usa típicamente para el diagnóstico inicial de infartos.[ref\(990\)](#)

Terapia con Fármacos

Dos grupos de fármacos[ref\(991\)](#) tienen un efecto directo sobre el tejido cardíaco y por lo tanto, son monitoreados por el laboratorio químico clínico. Estos son los glucósidos cardíacos y los fármacos antiarrítmicos. En la Tabla 31-2 se enumeran los fármacos cardíacos más frecuentemente monitoreados.

Glucósidos (ver pág. 607, métodos)

Los glucósidos incrementan la contractilidad en el corazón y son particularmente útiles en el tratamiento de la enfermedad cardíaca. El problema con los glucósidos reside en que la razón entre la dosis terapéutica y tóxica es muy baja. En niveles de dosis tóxicas, los glucósidos pueden trastornar la actividad eléctrica del corazón e inducir arritmias fatales. Puesto que los glucósidos tienen períodos largos de vida media en el cuerpo tienden a tener efectos acumulativos, por lo que requieren de un monitoreo cuidadoso de los niveles sanguíneos para reducir la posibilidad de los efectos secundarios tóxicos.

Lidocaína

La lidocaína es un compuesto anestésico que se administra intravenosamente como un bolo o infusión para suprimir las irregularidades ventriculares y para evitar la inducción de arritmias que pongan en peligro la vida, tales como la taquicardia ventricular. La lidocaína es un fármaco particularmente atractivo debido a que tiene pocos efectos secundarios y debido a que tiene poco o ningún efecto sobre la función miocárdica y la conducción cardíaca. La toxicidad puede manifestarse por accesos convulsivos intensos sin previo aviso. Por lo anterior, es importante tratar de evitar la toxicidad con lidocaína monitoreando los niveles del fármaco en el suero. La toxicidad es particularmente común en pacientes viejos.



Quinidina y otros fármacos (ver pág. 610)

La quinidina es un fármaco antiarrítmico cuyo principal efecto secundario es su capacidad de inducir arritmias severas por sí misma. De hecho, muchos fármacos antiarrítmicos tienen este potencial, y por esta razón los niveles de fármaco en la sangre son usualmente monitoreados de manera que puedan usarse los medicamentos antiarrítmicos de la manera más segura posible. Además de la quinidina, otros fármacos antiarrítmicos frecuentemente monitoreados son la *procainamida* y la *disopiramida*.

Cambio del Compuesto Analizado en la Enfermedad

Los compuestos analizados que más frecuentemente son usados como indicadores del diagnóstico de enfermedad cardíaca son las enzimas creatina cinasa y la lactato deshidrogenasa. Dos pruebas adicionales, la mioglobina y la aspartato aminotransferasa, han sido usados con poca frecuencia en el pasado; sin embargo, actualmente ninguna de las dos es recomendada para uso sistemático en el diagnóstico de infarto agudo al miocardio. Las proteínas estructurales, tales como la troponina T, la troponina I, y las cadenas ligeras de miosina, se han convertido en objeto de gran interés como marcadores de lesión miocárdica.

Estos marcadores de suero solamente son usados para el diagnóstico del infarto agudo al miocardio, IAM (o AMI por su abreviatura en inglés). Actualmente no existen marcadores bioquímicos únicos para las otras enfermedades cardíacas.

Mioglobina

El valor de los ensayos ^{ref(992)} de mioglobina en el infarto agudo al miocardio (IAM) está limitado por la aparición temprana y relativamente breve de la mioglobina en el suero, posterior al infarto miocárdico y por la presencia de grandes cantidades de mioglobina en el músculo esquelético, lo que reduce la especificidad de este compuesto para diagnosticar daño miocárdico.

La mioglobina se elimina rápidamente en la orina, y, como puede esperarse, una depuración renal reducida puede ocasionar elevaciones de mioglobina en el suero. La experiencia práctica con mioglobina no conduce hacia una mayor capacidad para detectar un infarto agudo al miocardio. Debido a que la mioglobina se elimina tan rápidamente, se han obtenido valores negativos falsos en el momento en que realmente ocurre un infarto agudo al miocardio. ^{ref(993)} Por ende, estos compuestos analizados se utilizan rara vez para verificar o desechar un infarto agudo al miocardio. La presencia de mioglobinuria puede utilizarse para corroborar una citólisis muscular masiva (inducida por trauma o fármacos) y para aumentar la probabilidad de una insuficiencia renal aguda inducida por la mioglobina.

Enzimas e isoenzimas en el infarto agudo al miocardio (ver págs. 603-608, métodos)

Posterior a la manifestación de los síntomas de infarto agudo al miocardio (IAM), existe un intervalo denominado “ventana de tiempo” en el cual las enzimas que se liberan del tejido miocárdico dañado se encuentran en cantidades elevadas en el suero. Esta relación temporal es única para cada compuesto analizado y varía un poco entre las personas, aunque se ha establecido un patrón específico (Fig. 31-1). Se requieren generalmente de 4 a 6 horas



después de la manifestación de un dolor en el tórax antes que la CC-MB alcance cantidades elevadas en el suero de los pacientes con infarto agudo al miocardio.[ref\(994\)](#) Se han reportado tiempos de detección que oscilan desde 2 hasta 15 horas.[ref\(995\)](#) Dicha actividad alcanza su expresión máxima entre las 12 y 24 horas, y generalmente regresa a sus niveles basales entre 24 y 48 horas. En un desarrollo temporal normal de las isoenzimas CC y LD, se observa que la CC-MB alcanza el punto máximo primero, y la LD₁ supera a la LD₂ en un lapso posterior de 5 a 20 horas. Se encontró que el tiempo promedio para alcanzar el punto máximo en la liberación de enzimas posterior al infarto, en un estudio en 47 pacientes, era de 18 horas para la CC-MB y la CC total, 24 horas para la ASAT, y 48 horas para la LD.[ref\(996\)](#) Dicha evolución temporal equivale a la progresión tradicional en los cambios enzimáticos, y frecuentemente ayuda a diferenciar un IAM sin complicaciones de una extensión o reinfarto. En tanto que este patrón en su totalidad es altamente sensible y específico de infartos, se han reportado patrones ligeramente diferentes en un 25% de los pacientes con IAM.[ref\(997\)](#) Estos estudios también reportan que los niveles de CC-MB son más altos y perduran más tiempo en pacientes con choque cardiogénico después del IAM.

De la discusión arriba mencionada se infiere que es necesario que las muestras se obtengan y analicen en intervalos apropiados para una interpretación clínica adecuada de los valores enzimáticos en el diagnóstico del IAM. Debido a que la secuencia temporal de los eventos es vital en la valoración de los cambios bioquímicos después del IAM, generalmente el diagnóstico de un infarto miocárdico no debiera efectuarse en base a una sola muestra aislada. La secuencia de muestras recomendadas indican que las muestras se obtengan en el momento de admitir al paciente y en intervalos de 2-4 horas, 6-8 horas y 12 horas posterior al momento en que se sospecha de un IAM.[ref\(998\)](#) Los resultados de las mediciones de CC deben estar disponibles durante las 24 horas del día, dentro de varias horas después de recibir la muestra, mientras que las mediciones de CC-MB deben llevarse a cabo de manera que los resultados estén disponibles cada 3-4 horas, los 7 días de la semana. La cantidad mínima total de muestras que se recomiendan para la interpretación es de dos, que deberán obtenerse dentro de las 12 horas posteriores al inicio de los síntomas. Los resultados normales de la CC-MB en muestras que se obtienen antes de 12 horas o después de 24 horas no debieran utilizarse para excluir el diagnóstico de IAM. Una muestra que se obtiene de esta manera puede reflejar el período antes o después de que ocurra un alza de CC-MB en algunos pacientes.[ref\(999\)](#) Se debe tener en cuenta que los valores normales para CC total no debieran utilizarse para descartar el IAM o para excluir una solicitud para un análisis de CC-MB.

Se han documentado una cantidad de casos en los que los niveles altos de CC-MB se acompañan por niveles totales normales de CC durante el curso inicial de un IAM.[ref\(1000\)](#) Sin embargo, en la mayoría de dichos casos hay un alza y caída de los valores totales de CC, aunque no se encuentre alguno que exceda el límite superior del rango normal. Actualmente existe evidencia de que tres subformas de CC-MM, denominadas *isoformas*, pueden elevarse antes que la CC-MB. A pesar de que el patrón no es totalmente específico para un IAM este enfoque puede ser útil en un futuro como indicador temprano de dicha enfermedad.[ref\(1001\)](#)

Isoformas de CC.[ref\(1002\)](#)

Debido a que la enzima responsable de la ruptura de lisina se encuentra en la sangre, solo las isoformas MM y MB no convertidas, es decir MM₃ y MB₂, se encuentran dentro de



las células; por esta razón a MM_3 y MB_2 se les denomina las *isoformas tisulares*. Como parte del recambio celular normal, MM_3 y MB_2 se liberan dentro de la circulación de la sangre donde generalmente MM_3 constituye únicamente el 30% de la concentración de CC-MM en el suero; MB_2 generalmente constituye el 50% de la CC-MB total en el suero. No obstante, después del daño al tejido, se libera una mayor cantidad de isoformas MM_3 y MB_2 desde el compartimento intracelular hacia la circulación sanguínea. Debido a que las relaciones de tejido/plasma de CC-MM y CC-MB son muy elevadas y la conversión de la isoforma no es inmediata, poco después de la muerte celular los niveles de plasma en las isoformas MM_3 y MB_2 no convertidas se encuentran presentes en mayores proporciones con respecto a las formas seroconvertidas. Debido a ello, es posible formular relaciones entre isoformas tisulares y sero-convertidas, ya sean MM_3/MM_1 o MB_2/MB_1 , y utilizar los incrementos en estas relaciones de isoformas para efectuar diagnósticos tempranos y sensibles de la lesión miocárdica. La relación MM_3/MM_1 es más fácil de medir que la proporción MB_2/MB_1 debido a que la CC-MM conforma la mayoría, alrededor del 75%, de la actividad de CC en el corazón.

**CC-MB Sérica Elevada en Condiciones
Diferentes a las del Infarto Agudo del Miocardio**

Angina severa
Fibrilación auricular crónica
Insuficiencia coronaria
Síndrome de aplastamiento
Pericarditis
Defibrilación
Implantación de un marcapaso
Angiografía coronaria
Cirugía de corazón abierto
Masaje cardiaco externo o resucitación cardiopulmonar
Envenenamiento por monóxido de carbono
Hipertermia maligna
Distrofia muscular, como el síndrome de Duchenne
Poliomiositis
Cirugía prostática o infarto
Dermatomiositis
Síndrome de Reye
Neoplasia Maligna

Causas de Aumento de la Relación ("vuelta") LD_1/LD_2

Infarto agudo al miocardio
Infarto renal agudo
Hemólisis causada por
Válvulas prostéticas del corazón
Anemias hemolíticas
Anemias megaloblásticas



Procesamiento de las muestras Neoplasia Maligna

Las isoenzimas en condiciones diferentes a las de infarto al miocardio.

Con frecuencia el patrón de elevaciones de las enzimas en el suero en condiciones diferentes a las del infarto al miocardio, difiere del que se observa durante el infarto al miocardio. En estas circunstancias las isoenzimas (ver recuadros) frecuentemente se encuentran elevadas de manera crónica. Estas situaciones de falsos positivos realzan la importancia de efectuar pruebas a múltiples muestras obtenidas a intervalos adecuados. El patrón de las isoenzimas CC que se encuentra en el feto en desarrollo se duplica en el adulto en algunas condiciones patológicas. Tal alteración se observa con mayor frecuencia en el músculo esquelético. En el adulto, la CC está predominantemente presente en forma de MM. Sin embargo, en el músculo fetal prevalece la forma BB hasta la décimo sexta semana de gestación,[ref\(1003\)](#) en cuyo momento la expresión del gen codificador de la subunidad M se incrementa de manera significativa. Las enfermedades del músculo esquelético caracterizadas por la regeneración de la perfusión sanguínea, con frecuencia se relacionan con niveles incrementados de las formas fetales isoméricas de CC. Por ende, la distrofia muscular de Duchenne, la polimiositis, y algunas otras formas de rabdomiolisis son algunos ejemplos de las enfermedades del músculo esquelético en las que con frecuencia se encuentran niveles altos de CC-MB sérica. Estos incrementos son proporcionales al grado de regeneración de la fibra muscular.[ref\(1004\)](#) En estas enfermedades crónicas, los niveles séricos de CC total y las actividades CC-MB no muestran el alza y baja propia de un infarto al miocardio, sino que más bien tienden a permanecer constantes a lo largo del tiempo. No obstante, debido a que el músculo esquelético contiene CC-MB, los niveles de CC-MB con frecuencia se encuentran en el rango asociado con el infarto al miocardio. En vista que la cantidad absoluta de CC en el músculo esquelético es 5 ó 10 veces mayor a lo que se observa en el tejido cardíaco, el alza real de CC total que se observa en el suero en los trastornos del músculo esquelético con frecuencia son drásticamente más elevadas que aquellas que se observan en el infarto al miocardio, a pesar de que la proporción en que se encuentra CC-MB es generalmente bastante baja. Asimismo, el patrón de la isoenzima LD no refleja enfermedad o daño miocárdico.

Además de las condiciones patológicas tratadas anteriormente, las elevaciones de las proteínas cardíacas, las isoenzimas CC, las isoenzimas LD, y ASAT obviamente se encuentran presentes en cualquier situación que aumente el escape de las células miocárdicas. Algunos ejemplos son traumas por concepto de cirugía o tórax inestable y enfermedades que involucren el miocardio, tales como miocarditis, insuficiencia cardíaca congestiva, y arritmias. Igualmente, ciertos fármacos pueden afectar el músculo esquelético y cardíaco. El abuso de algunas fármacos como el alcohol y la cocaína pueden causar una alza en los compuestos analizados que se mencionaron anteriormente.

Sensibilidad y especificidad de las isoenzimas de CC y LD en los infartos al miocardio.

Es obvio que la interpretación de las enzimas de suero en el diagnóstico del infarto agudo al miocardio resulta un tanto confusa debido a los resultados falsos positivos y falsos negativos. Galen y Gambino[ref\(1005\)](#) han utilizado el modelo con valor pronóstico para expresar

matemáticamente la utilidad clínica de las pruebas de laboratorio en varias poblaciones de pacientes. La Tabla 31-1 enumera los valores pronósticos positivos y negativos de CC-MB y de la razón de cambio (“vuelta”) de LD para las poblaciones de alta y baja prevalencia. El uso de CC-MB en una población de atención de padecimientos coronarios, con un 50% de prevalencia asumida de la enfermedad, obviamente incrementa los valores pronósticos de niveles elevados de enzimas. Si se compara con una población de baja prevalencia como es la sala de emergencias (5%) en la que se pueden observar muchas de las condiciones que se describen en el anterior recuadro de la izquierda, se minimiza enormemente la utilidad de esa misma prueba enzimática para evaluar el IAM.

Las isoformas MM no son cardiospecíficas y tienen una sensibilidad diagnóstica de sólo 70% dentro de las primeras 6 horas posteriores del infarto al miocardio. En contraste, la proporción MB_2/MB_1 es altamente cardiospecífica, aunque las isoformas MB se encuentren presentes en concentraciones menores que las isoformas MM. Se ha hecho factible medir las isoformas mediante el uso de un sistema electroforético rápido de alto voltaje (Helena REP y CardioREP, fabricado por Helena Laboratories, Beaumont, Texas). La proporción MB_2/MB_1 demuestra tener una sensibilidad diagnóstica excelente, superior al 90%, dentro de 4 a 6 horas posteriores al inicio de los síntomas en pacientes con infarto al miocardio (IM). De igual forma, se ha planteado también que la proporción MB_2/MB_1 se utilice como una herramienta de diagnóstico para monitorear el éxito de la reperfusión cardíaca posterior a la terapia trombolítica, así como para discriminar cuales pacientes deben ser admitidos en el departamento de emergencias para mayores exploraciones clínicas de infarto al miocardio.

Uso diagnóstico de la troponina T e I y cadenas ligeras de miosina

Troponina T [Tref\(1006\)](#)

Tras un infarto al miocardio, la TnT aumenta en el suero después de 4 horas, y llega a alcanzar un pico inicial o un máximo constante entre 2 y 5 días. Un segundo pico de TnT es observado en muchos de los pacientes de IM. Este segundo pico ocurre debido a que la TnT tiene tanto reservorios citosólicos como estructuralmente unidos a TnT; el primer pico resulta de la liberación del reservorio citosólico, y el segundo pico refleja la liberación más lenta del componente estructural que ocurre más tarde en el proceso de necrosis miocárdica.

El uso de TnT para un diagnóstico temprano de infarto al miocardio no parece ofrecer ventaja alguna sobre el uso de CC-MB debido a la presencia inicial de CC-MB y TnT en el suero, y por ende, el intervalo de tiempo en el que se puede efectuar un diagnóstico de IM, parece ser muy similar para ambas proteínas. Por otra parte, el sistema de mediciones de TnT proporciona ventajas en comparación al de CC-MB cuando existen procesos de enfermedad al miocardio tanto musculares como esqueléticos. Ello se debe a que la TnT es verdaderamente cardiospecífica y su aparición denota trastornos del músculo esquelético mientras que la interpretación de CC-MB en este caso puede confundirse, ya que el músculo esquelético contiene una pequeña proporción de CC-MB de hasta alrededor del 3% del total. Debido a la larga vida media de la TnT sérica, los niveles de TnT pueden proporcionar datos diagnósticos importantes acerca de un IM después de que el CC-MB en el suero ha llegado a niveles normales. Además, la TnT puede ofrecer datos substanciales acerca de la historia reciente de la disfunción miocárdica en pacientes isquémicos. La TnT se ha utilizado para el pronóstico



de pacientes inestables con angina. El pronóstico en este contexto consiste en el proceso de discriminar cuales de esos pacientes están propensos a continuar padeciendo de infarto al miocardio.[ref\(1007\)](#)

Troponina I.

Aunque la TnI tiene un peso molecular bajo en comparación al de TnT (37 kilodaltones) y la CC-MB (85 kilodaltones), sus características de liberación y por ende su uso como un indicador temprano de infarto al miocardio son casi similares a los de las otras dos proteínas. La TnI parece ser idéntica a la TnT básicamente en todas las aplicaciones clínicas posibles, y su determinación proporciona las mismas ventajas sobre la CC-MB que las de la TnT. Debido a que ofrecen la misma información, la selección entre TnI o TnT se basará en el desempeño analítico, comodidad, rapidez, y costo global del ensayo.

Cadenas ligeras de miosina.[ref\(1008\)](#)

La liberación de las cadenas ligeras de Miosina (CLM) después de un infarto al miocardio muestra un patrón con dos picos: el primero proviene del reservorio citosólico que ocurre entre las 24 y 36 horas, el segundo proviene de la degradación del aparato contráctil, que ocurre entre las 80 y 100 horas.

Se han reportado formas cardiospecíficas de las CLMs y se propusieron varios ensayos a principios de la década de 1980. La información clínica que proporciona la medición de CLM es igual al que proporciona la TnT y TnI para la mayoría de los casos. Sin embargo, el menor reservorio citosólico de las CLMs y la naturaleza de la liberación de CLMs, hacen que su uso ofrezca menos ventajas que el de las troponinas. La medición de CLMs puede llegar a ser útil para la clasificar la magnitud del infarto y las aplicaciones en la prognosis debido a la liberación sostenida y las características de depuración lenta de esta proteína después de una necrosis celular miocárdica.

Uso de los marcadores bioquímicos en el manejo de pacientes con dolor de pecho

Una gran variedad de pruebas bioquímicas están actualmente disponibles para la evaluación de pacientes con un diagnóstico probable de infarto agudo al miocardio. En tales casos es importante que las decisiones concerniente al estado cardíaco del paciente se efectúen de manera rápida y precisa. Algunos investigadores han sugerido que las isoformas CC-MB que actúan dentro de las 6 horas a partir del inicio el dolor de pecho, pueden ser útiles para determinar cuales pacientes podrían beneficiarse de una terapia trombolítica.[ref\(1009\)](#) El uso del electrocardiograma (ECG) junto con marcadores bioquímicos adecuados a lo largo de períodos oportunos (Fig 31-2) puede ser útil para determinar que pacientes requieren ser admitidos a la costosa unidad de cuidados cardíacos, quienes pueden ser monitoreados sin peligro en instalaciones de cuidados intermedios y quienes pueden darse de alta sin riesgo.[ref\(1010\)](#) Con el fin de proporcionar el mejor apoyo para los médicos clínicos, estos marcadores deben medirse de acuerdo con el muestreo y los tiempos de entrega de resultados que se mencionaron anteriormente.

La medición de las isoenzimas de LD, CLMs, o troponinas T e I, pueden ser de ayuda para aquellos pacientes que se evalúan muchas horas después del inicio del dolor. Una alza en la LD₁ con reversión concomitante de la proporción normal de las LD₁/LD₂, conocida como “vuelta de LD”, usualmente ocurre de 12 a 24 horas después del infarto y puede durar por



varios días. Las alzas en las troponinas o CLMs igualmente pueden durar por muchos días después del infarto y pueden mostrar mayor especificidad para el daño miocárdico que la LD.[ref\(1011\)](#)

Métodos de Análisis

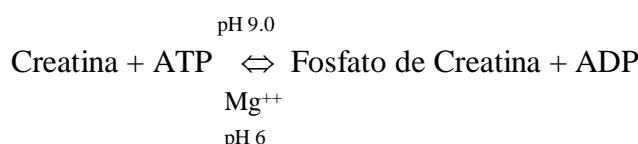
Creatina cinasa

Kory M. Ward

John A. Lott

Principios de análisis y uso corriente.

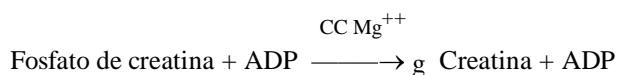
La creatina cinasa cataliza la fosforilación reversible de la creatina al utilizar el ATP como donante del grupo fosfato. La dirección de la reacción depende del pH; a pH neutral se favorece la formación de ATP, mientras que la formación del fosfato de creatina se favorece a pH de 9.0.



Se han encontrado diferentes propiedades de la reacción enzimática para cada una de las fracciones isoenzimáticas de CC. Por lo tanto, la determinación de la actividad de CC total en suero requiere establecer un compromiso de condiciones de reacción.[ref\(1012\)](#)

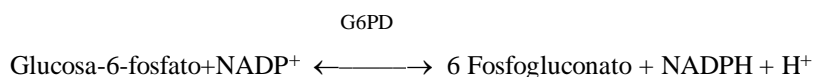
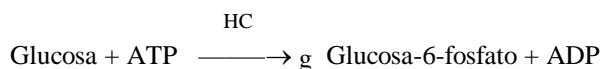
Los métodos para determinar la actividad de CC total se pueden basar en la medición de los productos que se forman en las reacciones tanto hacia adelante como en sentido opuesto. La reacción “hacia adelante” es aquella que lleva a la formación del fosfato de creatina. El uso de la reacción hacia adelante para medir la actividad CC se ha llevado a cabo mediante el sistema de medición de la fracción del fosfato de creatina que se forma en la reacción,[ref\(1013\)](#) y la determinación del ADP que también se produce en la reacción hacia adelante.[ref\(1014\)](#) Estos procedimientos han venido a ser obsoletos, debido básicamente a la presencia de varias interferencias y al desarrollo de métodos alternos (ver edición previa para mayores detalles).

Casi todos los métodos para medir la actividad de CC total utilizan la reacción reversa, de fosfato de creatina a creatina (Tabla 31-4). Este método se basa en los principios propuestos por Oliver y modificados por Rosalki[ref\(1015\)](#) y otros. La reacción primaria catalizada por CC da por resultado la producción de creatina y ATP. El ATP producido en la reacción primaria es empleado luego en un análisis enzimático acoplado de glucosa empleando hexocinasa (HC) y glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PD). La producción de NADPH en la reacción indicadora es monitoreada a 340 nm y está relacionada con la actividad de CC en la muestra del paciente.

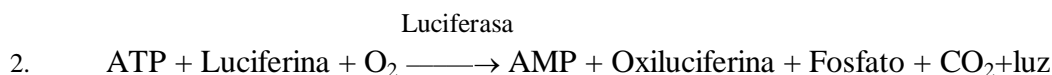




pH 6,8



Se han propuesto otros procedimientos para la determinación de la actividad CC, aunque rara vez son usados. Estos procedimientos alternativos incluyen un análisis fluorométrico, mediante el cual la creatina formada en la reacción primaria se hace reaccionar con ninhidrina (hidrato de tricetohidrindeno) en presencia de KOH, para formar un compuesto fluorescente. También se ha desarrollado un análisis bioluminiscente en el cual el ATP formado en la reacción primaria es acoplado a una reacción indicadora empleando la reacción de luciferin-luciferasa de la manera siguiente:



La intensidad de la luz emitida en la reacción indicadora es proporcional a la actividad de CC de la muestra.[ref\(1016\)](#) Este método es extremadamente sensible; sin embargo su uso es limitado por la necesidad de instrumentación especializada y por el costo de los reactivos.

Especimen.

Las muestras aceptables son: suero, plasma anticoagulado con heparina, líquido cefalorraquídeo (LCR) y líquido amniótico. Son inaceptables anticoagulantes diferentes a la heparina porque inhiben la actividad CC.[ref\(1017\)](#) Debe evitarse la hemólisis por la interferencia de la adenilato cinasa del eritrocito, sin embargo, se ha encontrado que concentraciones de hemoglobina de hasta 320 mg/L no alteran apreciablemente las actividades medidas de CC.[ref\(1018\)](#) La ictericia y la lipemia pueden afectar las actividades cuantificadas de CC a causa de la interferencia con las lecturas de absorbancia del instrumento.

Las enzimas citoplásmicas de CC muestran grados variables de estabilidad durante el almacenamiento. La CC-BB es la fracción isoenzimática menos estable. La adición de un compuesto que contenga tiol, como la *N*-acetilcisteína o el 2-mercaptoetanol, puede ayudar a estabilizar la actividad la CC-BB.[ref\(1019\)](#) La actividad catalítica de las isoenzimas de CC puede perderse por inactivación térmica, oxidación de los grupos reactivos tiol, aumento de pH por pérdida de CO₂, y por irradiación con luz.[ref\(1020\)](#)

Los especímenes pueden ser guardados en la oscuridad a 4^o C hasta por 2 semanas y a -20^o C hasta por 1 mes, con pérdida mínima de actividad.

Intervalos de referencia.



Los intervalos de referencia en los individuos saludables dependen de las condiciones de la reacción del análisis usado para las determinaciones de CC. Recientemente han sido revisados los diversos intervalos de referencia y tipos de análisis para la actividad total de CC.^{ref(1021)} Las actividades de CC en suero son afectadas por la edad, sexo, y raza.^{ref(1022)} Los recién nacidos usualmente muestran actividad aumentada de CC a causa del trauma de músculo esquelético durante el nacimiento. La masa muscular puede afectar las actividades de CC séricas; los hombres generalmente muestran actividades de CC más altas comparado con las mujeres porque tienen más masa muscular. Se ha reportado por 239 laboratorios que los percentiles 5 y 95 para el intervalo de referencia de la actividad de CC total corresponden a 130 U/L y 253 U/L respectivamente.

Isoenzimas de creatina cinasa

Monika Payne

Peter Hickman

Principios del análisis y uso actual.

La separación por electroforesis (Tabla 31-5, método 1) de las fracciones isoenzimáticas de CC ha sido, hasta recientemente, la técnica más común para la cuantificación de las isoenzimas de CC. Las subunidades monoméricas M y B poseen cargas diferentes, lo cual permite la separación de las diferentes fracciones isoenzimáticas. Los medios de soporte que han sido usados incluyen agarosa, acetato de celulosa, y poliacrilamida. En la electroforesis en gel de agarosa, a pH 8.6, la CC-BB migra la mayor distancia del punto de aplicación hacia el ánodo, la CC-MM permanece ligeramente catódica hacia el punto de aplicación y la CC-MB tiene una movilidad intermedia entre la CC-BB y la CC-MM. La isoenzima mitocondrial de CC migra catódicamente hacia la fracción CC-MM. Otra variante de CC que puede verse después de la electroforesis es la macro-CC de tipo 1, un complejo que consta de una inmunoglobulina, usualmente IgG, y la CC-BB.

Después de la separación electroforética de las fracciones de isoenzima individuales, el medio de soporte es incubado con el sustrato de CC para permitir la formación de NADPH. La cantidad de NADPH formado puede ser determinada directamente por su fluorescencia o por acoplamiento al NADH con una reacción de diaforasa para formar un producto coloreado. La cantidad de fluorescencia o de producto coloreado formado se mide usando un densitómetro; el grado de fluorescencia o de color es proporcional a la cantidad de CC presente en cada fracción de isoenzima.

Una ventaja importante de usar la electroforesis para la separación de las isoenzimas CC, es que las bandas atípicas, tales como la macro-CC y la CC mitocondrial pueden ser detectadas y pueden requerir una investigación más profunda. Sin embargo, desafortunadamente, el análisis de isoenzimas de CC por electroforesis es muy tardado y por ello es inadecuado para el tipo de pruebas de urgencia. También, se requiere cierta destreza para la interpretación de los resultados electroforéticos, especialmente si están presentes bandas migratorias atípicas.

La separación de las isoenzimas de CC en base a la carga ha sido efectuada por medio de cromatografía de intercambio iónico (Tabla 31-5, método 2). Una desventaja de este procedimiento es que puede ocurrir acarreio de la CC-MM en la fracción CC-MB en especímenes con actividades CC-MM muy aumentadas, dando lugar a un resultado falsamente



aumentado de CC-MB. [ref\(1023\)](#) Esta técnica se usa raramente en los laboratorios clínicos actualmente.

Se han desarrollado métodos inmunológicos para la cuantificación de la CC-MB y son las técnicas más frecuentemente usadas hoy en día. Se han desarrollado dos tipos de métodos inmunológicos para la cuantificación de CC-MB. Un tipo de procedimiento inmunológico, denominado *inmunoinhibición* (Tabla 31-5, método 3), utiliza un anticuerpo específico que inhibe la subunidad monomérica CC-M; la subunidad de CC-B no es afectada y por consiguiente retiene su actividad catalítica. Luego se mide la actividad CC-B. Como la fracción CC-B representa la mitad de la actividad mostrada por una enzima CC-MB no inhibida, el aumento al doble de la actividad de CC-B teóricamente produce al actividad CC-MB presente en la muestra. Este método se basa en la presunción de que la muestra no contiene CC-BB o macro-CC. La presencia de estas isoenzimas resultará en un falso incremento de CC-MB, a menos que se utilice una reacción blanco. A causa de la interferencia de la CC-BB y la macro-CC, el uso de los métodos de inmunoinhibición ha sido limitado y han sido sustituidos en gran parte por el uso de análisis inmunológicos de masa de CC-MBB.

Los análisis de masa (Tabla 31-5, método 4) son las técnicas usadas con más frecuencia para la determinación de la CC-MB. El anticuerpo dirigido contra la CC-MB se une en forma covalente a una superficie sólida. La CC-MB de la muestra reacciona con el anticuerpo unido formando un complejo antígeno-anticuerpo. Luego se añade un segundo anticuerpo, el cual está marcado, por ejemplo mediante la conjugación con una enzima como la fosfatasa alcalina. Este segundo anticuerpo se dirige contra otro sitio antigénico en la molécula de CC-MB, diferente al del primer anticuerpo. El anticuerpo marcado con la enzima reacciona con la CC-MB unida al anticuerpo, formando un sandwich anticuerpo/antígeno/anticuerpo marcado. Después de un paso de lavado, que se usa para remover cualquier anticuerpo marcado no unido, se añade un substrato que reacciona con la enzima que se ha conjugado al anticuerpo para formar un producto cuantificable; la velocidad de formación del producto es proporcional a la actividad CC-MB presente en el espécimen.

Los análisis de masa de CC-MB tienen la ventaja de tener interferencia mínima por parte de especímenes con actividad de CC-BB, o de actividades muy aumentadas de CC-MM. Además, la hemólisis, fármacos, o inhibidores de la actividad enzimática de CC no afectan las mediciones de masa de la CC-MB. En virtud de que estos ensayos han sido automatizados en su mayoría y de que el tiempo de análisis es bastante corto, las mediciones de masa son adecuadas para el tipo de análisis de urgencia

Especímen.

El suero es usualmente el espécimen de elección. Debe evitarse el uso de EDTA y de plasma con citrato, así como de muestras recolectadas con oxalato o fluoruro como preservativo, en vista de que estas sustancias inhiben la actividad de la enzima. Los especímenes hemolisados pueden ser inadecuados para algunos análisis por la presencia de la adenilato cinasa de los eritrocitos, la cual interfiere con las mediciones de actividad de la CC-MB. La mayoría de los análisis que miden la actividad CC incluyen ahora inhibidores de la adenilato cinasa. Sin embargo, muestras con hemólisis importante pueden contener adenilato cinasa en cantidad suficiente como para hacer ineficaces a los inhibidores que puedan estar presentes.



Las muestras pueden ser guardadas hasta por 5 días a 4^o C, o congeladas a –20^o C durante varias semanas con una pérdida mínima de actividad. A temperatura ambiente, la CC-MB puede comenzar a disociarse en sus subunidades monoméricas, en un lapso de dos horas.[ref\(1024\)](#) El congelamiento y descongelamiento frecuente de las muestras, puede dar también por resultado la pérdida de la actividad enzimática.

Intervalos de referencia.

El intervalo de referencia normal para la CC-MB depende del método de análisis usado para su cuantificación. Con los métodos, como la electroforesis y la inmunoinhibición, que miden la actividad CC-MB, el porcentaje de actividad CC total representado por la CC-MB normalmente es reportado junto con las unidades totales de CC-MB.

Como el músculo esquelético puede contener cantidades variables de CC-MB, se considera que un porcentaje “normal” de CC-MB fluctúa de 0 a 3%. Los individuos con distrofias musculares u otros procesos asociados con regeneración de músculo esquelético pueden mostrar actividades de CC-MB muy aumentadas en la sangre.[ref\(1025\)](#) Los pacientes con lesión miocárdica y de músculo esqueléticos simultáneamente, pueden tener un porcentaje de CC-MB que caiga dentro del intervalo de referencia normal debido al efecto de dilución por la CC-MM procedente del músculo esquelético. Por ello es imperativo que se usen tanto el porcentaje de CC-MB como las unidades totales de actividad de CC-MB para la evaluación de pacientes con sospecha de infarto de miocardio.

Los análisis para CC-MB que miden la masa de enzima presente, son menos afectados por lesión concomitante de músculo esquelético. Sin embargo, se han observado aumentos significativos en las concentraciones de masa de CC-MB en la sangre de pacientes que han sufrido trauma muscular severo.[ref\(1026\)](#) En vista de que las mediciones de CC total son reportadas en unidades por litro (U/L), mientras que las mediciones de concentración de masa son reportadas en microgramos por litro (gmg/lt), se usa el cálculo de una nueva función denominada *índice relativo*, para relacionar las concentraciones de masa CC-MB con las actividades de CC total. El uso del índice relativo es necesario para evaluar pacientes con actividades de CC total muy altas. Los pacientes con actividades de CC total muy aumentadas también pueden tener concentraciones substancialmente altas de CC-MB por lesión de músculo esquelético. No debe usarse el índice relativo para la evaluación de pacientes con valores de CC-MB menores de 10 gmg/lt o para las muestras que tengan actividades de CC total dentro del rango normal de referencia. El índice relativo se calcula de la siguiente manera:

$$\text{Índice relativo (IR)} = \frac{\text{CC-MB (mg/L)}}{\text{CC total (U/L)}} \times 100$$

Para hacer un diagnóstico definitivo de infarto de miocardio deben estar aumentados tanto el valor de masa de la CC-MB como el índice relativo.

Digoxina y Digitoxina

I-Wen Chen



Linda A. Heminger

Principios del análisis y uso actual.

Los glucósidos cardiotónicos, digoxina y digitoxina se encuentran en forma natural en cierto número de plantas. El término *digitálicos* (digitalis en inglés) se usa para designar el grupo completo de compuestos. Estos compuestos se usan para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca, palpitación irregular auricular, fibrilación auricular y taquicardia supraventricular debido a su capacidad de mejorar la fuerza de las contracciones miocárdicas y de disminuir la frecuencia cardíaca.

La decisión de tratar a los pacientes con digoxina o con digitoxina es determinada principalmente por la capacidad del paciente de metabolizar y excretar la droga. La eliminación de la digoxina depende de la función renal, especialmente de la tasa de filtración glomerular. En sujetos con función renal normal, la digoxina tiene una vida media de 1.5 a 2 días. La vida media se prolonga hasta 4 a 6 días en pacientes con insuficiencia renal. La digitoxina difiere de la digoxina en que su sitio principal de metabolismo es el hígado. El único metabolito activo de la digitoxina es la digoxina, que representa sólo una pequeña fracción de los metabolitos totales. La porción de digitoxina que no es metabolizada es excretada a través del tracto biliar hacia el intestino, es reabsorbida por la circulación entero-hepática y reciclada hacia el hígado hasta que es completamente metabolizada. Como el metabolismo y la excreción de la digitoxina son independientes en gran medida de la función renal, el uso de esta droga es más apropiado en los pacientes con insuficiencia renal.

Los compuestos digitálicos tienen un rango terapéutico relativamente estrecho. Además, el deterioro súbito de la función renal o hepática pueden producir toxicidad si no se ajusta la dosis. Estos dos factores hacen necesario el monitoreo frecuente de las concentraciones de digitálicos. La solicitud más frecuente es la determinación de las concentraciones de digoxina. Los análisis de digitoxina se hacen mucho menos frecuentemente debido al uso menos frecuente de la droga.

Los análisis cromatográficos como la cromatografía de gases,^{ref(1027)} y los bioensayos basados en la inhibición de ATPasa de Na^+ y de K^+ en los glóbulos rojos^{ref(1028)} son laboriosos y requieren tiempos largos, por lo que han sido esencialmente descontinuados. Los métodos más comunes en uso hoy en día en los laboratorios clínicos son los inmunoensayos. Hasta hace poco, el radioinmunoanálisis (RIA) (Tabla 31-6, método 1) fue el método más comúnmente usado para la medición de las concentraciones de digoxina en el suero.^{ref(1029)} Sin embargo, para eliminar la necesidad de radioisótopos, otros procedimientos de inmunoensayo ya han reemplazado al RIA. El método de inmunoensayo más usado hoy en día es la polarización de fluorescencia (IPF) (Tabla 31-6, método 2). Este método utiliza la unión competitiva de la digoxina en el suero del paciente y la digoxina marcada con fluoresceína unida al anticuerpo antidigoxina. Ver el capítulo 4 en cuanto a principios de polarización de fluorescencia. Fue necesario incluir un paso de pretratamiento de la muestra a la versión antigua de este análisis, para minimizar interferencias de compuestos fluorescentes unidos a la proteína en la muestra. La adición de ácido tricloroacético para precipitar las proteínas, seguido de centrifugación, produce un sobrenadante claro, libre de proteínas, adecuado para el análisis.

Se han desarrollado otros marcadores no isotópicos para ser usados, incluyendo bioluminiscencia, fluorescencia retardada y marcadores enzimáticos. En la técnica de



inmunoensayo homogéneo amplificado por enzima (TIAE) (Tabla 31-6, método 3) se ha acoplado la enzima glucosa- 6-fosfato deshidrogenasa a la digoxina. La competencia entre la digoxina del paciente y la digoxina marcada por el anticuerpo antidigoxina permite la determinación de la cantidad presente en el suero del paciente. Esta técnica se describe mejor en el capítulo 13.

El sistema IDEC de inmunoensayo enzimático homogéneo utiliza dos subunidades inactivas de la enzima b-galactosidasa producida mediante técnicas de DNA recombinante.[ref\(1030\)](#) Una subunidad es unida covalentemente a la digoxina, la cual no interfiere con la reasociación espontánea de la enzima para formar una enzima activa. En el análisis, la digoxina presente en el suero del paciente, compite con la digoxina unida a la enzima para la unión al anticuerpo de antidigoxina. La unión de la digoxina adherida a la enzima al anticuerpo antidigoxina da por resultado que las dos mitades de la enzima son incapaces de reasociarse para formar la enzima funcional. Sin embargo, si el suero del paciente contiene digoxina, una porción del anticuerpo se combinará con el fármaco del paciente, permitiendo que algunas de las subunidades enzima-digoxina permanezcan disponibles para la formación de enzima activa. El grado de actividad de la enzima está relacionado directamente con la concentración de digoxina presente en el suero del paciente.

Una técnica de inmunoensayo por columna de afinidad (E.I. duPont de Nemours, Wilmington, Delaware) separa las especies libres y las de enzima-anticuerpo unidas a digoxina por medio de cromatografía de afinidad[ref\(1031\)](#) (Tabla 31-6, método 4). En este procedimiento, el fragmento $F(ac')_2$ del anticuerpo de digoxina es marcado con la enzima b-galactosidasa. En el reactivo está presente un exceso del conjugado enzima-anticuerpo, de manera tal que toda la digoxina de la muestra puede unirse al anticuerpo. Después de este período de incubación inicial, la muestra es eluida a través de una columna de afinidad localizada dentro del cartucho para la prueba. La columna de afinidad contiene ouabaína, un análogo de la digoxina. Cualquier conjugado de anticuerpo-enzima que no está unido a la digoxina del suero del paciente, es retenido dentro de la columna. Los complejos digoxina-enzima-anticuerpo pasan a través de la columna en el cartucho de la prueba, donde la porción enzimática del complejo cataliza la hidrólisis del sustrato *orto*-nitrofenil b-D-galactopiranosido (ONGP) a *orto*- nitrofenol (ONP). El cambio en la absorbancia a 405 nm, resultante de la formación de ONP es directamente proporcional a la concentración de digoxina en la muestra del paciente.[ref\(1032\)](#)

Se han descrito numerosas interferencias en muchos análisis de digoxina. Ciertas drogas y metabolitos pueden tener reacción cruzada con los anticuerpos usados en los inmunoanálisis para medir la digoxina. Por ejemplo, la acumulación de espironolactona y sus metabolitos, que ocurre en pacientes con daño renal o hepático, son una fuente de interferencia.[ref\(1033\)](#) La presencia de factores inmunorreactivos semejantes a la digoxina (FISD) es otra fuente de interferencia que hace difícil la interpretación de los niveles de digoxina. Los FISDs han sido detectados en muestras de pacientes con ciertos estados normales y patofisiológicos, incluyendo disfunción hepática o renal, mujeres embarazadas y neonatos.[ref\(1034\)](#)

Con objeto de identificar más fácilmente muestras que contengan FISDs, se han hecho intentos para correlacionar diversas características de pacientes con concentraciones de FISDs en el suero de neonatos o infantes. Reportes contradictorios han relacionado concentraciones de FISDs en suero con la edad del paciente[ref\(1035\)](#) y con el peso al nacer.[ref\(1036\)](#) No se ha



descrito ninguna correlación entre el sexo y la concentración de FISDs.[ref\(1037\)](#) Aunque si se ha descrito una fuerte correlación entre concentraciones de FISDs y concentraciones de bilirrubina en suero de infantes.[ref\(1038\)](#)

Muestra.

El suero, o el plasma recolectada utilizando heparina o EDTA como anticoagulante es aceptable para las muestras. Las muestras pueden ser almacenadas desde 2^o hasta 8^o C hasta por 1 semana. Para períodos más largos de almacenamiento, las muestras deben mantenerse congeladas a -20^o C.

Intervalo de Referencia.

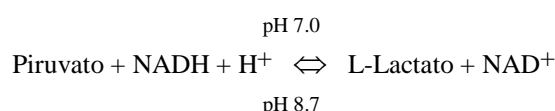
El rango terapéutico usual para la digoxina va de 0.9 hasta 2.0 mg/mL. Las concentraciones por encima de 2.0 mg/mL son generalmente consideradas tóxicas. Sin embargo, la respuesta del paciente al fármaco puede variar ampliamente. Por consiguiente, los resultados del paciente individual deben ser interpretados conjuntamente con la historia clínica y el estado de enfermedad subyacente.

Lactato deshidrogenasa

Amadeo J. Pesce

Principios de análisis y uso actual.

La deshidrogenasa láctica es una enzima que tiene una distribución casi ubicua en los tejidos. La enzima cataliza la interconversión de piruvato y L-lactato con NADH o NAD⁺ respectivamente, actuando como un cofactor. La dirección de la reacción catalizada por LD es dependiente del pH; la reacción de piruvato a lactato tiene un pH óptimo cercano a 7.0 mientras que el pH óptimo de la reacción inversa es de 8.7:



Los métodos actuales para la medición de la actividad de LD utilizan el cambio en la concentración de los cofactores NAD y NADH a medida que la reacción procede. La velocidad de aparición o desaparición de la absorbancia de NADH a 340 nm es proporcional a la actividad del LD (Tabla 31-7, métodos 1 y 2).[ref\(1039\)](#) La reacción puede ser seguida tanto en la dirección hacia la formación del piruvato (L-P) como en la dirección opuesta (P-L). Sin embargo, se ha demostrado que cuando se utiliza la reacción P-L, la velocidad de reacción inicial no es lineal y se convierte en lineal hasta después de alrededor de 20 segundos.[ref\(1040\)](#) Sin embargo, la reacción P-L es utilizada más frecuentemente debido a ciertas consideraciones. En la dirección P-L, se necesita sólo alrededor de 3% del costoso cofactor NADH cuando se compara con la dirección L-P.[ref\(1041\)](#) Además, la reacción P-L se lleva a cabo a una velocidad más rápida que la reacción contraria. Ambas reacciones P-L y L-P son comúnmente utilizadas porque no hay un método para LD generalmente aceptado. La



reacción puede ser monitoreada a través de ambos tipos de mediciones, absorbancia cinética y de punto final; no obstante, el monitoreo cinético es óptimo y el más frecuentemente utilizado.

Además del monitoreo de los cambios en las concentraciones NADH, algunos métodos más antiguos medían las actividades LD utilizando análisis colorimétricos de los reactivos producidos o consumidos durante la reacción. La única reacción de este tipo que todavía se utiliza hoy en día es la reacción de tetrazolio, la cual es frecuentemente utilizada para la identificación de fracciones de isoenzimas de LD después de la separación electroforética (ver capítulo 10). En esta reacción, el NADH reduce el colorante tetrazolio para formar un compuesto coloreado (Tabla 31-7, método 3). La intensidad colorante tetrazolio es proporcional a la actividad de LD (ver también adelante).

Muestra.

El análisis de LD debe ser realizado utilizando suero como especimen porque el plasma anticoagulado con algunos compuestos, tales como el oxalato, puede interferir con la prueba. Los eritrocitos contienen altas actividades de LD. Por consiguiente cualquier hemólisis visible puede causar un aumento falso en la actividad de LD. Las diferentes isoenzimas de LD tienen diversos grados de estabilidad. La estabilidad depende de la temperatura a la cual es almacenada la muestra ya que ningún método simple de almacenamiento impediría que haya alguna pérdida de actividad de LD. La uniformidad en el procedimiento de almacenaje rendirá los resultados más precisos. Las muestras no deben ser congeladas, ya que esta técnica de almacenamiento resulta en pérdidas de actividad enzimática, especialmente las fracciones de las isoenzimas LD₄ y LD₅.

Rango de referencia.

La actividad de LD sérica depende del método y la temperatura utilizadas para su análisis. Los individuos hasta de 12 años de edad generalmente muestran actividades de LD que son de 10% al 15% más altas que la de los adultos. Los intervalos de referencia típicos para la actividad de LD en adultos, determinada mediante la reacción de P-L a 37^o C son aproximadamente de 90 a 320 U/L. La LD también puede ser medida en líquido cefalorraquídeo (LCR). Las actividades de LD en LCR son aproximadamente del 10% las que se encuentran en una muestra de suero correspondiente tomada del paciente al mismo tiempo que fue obtenido el LCR.

Isoenzimas de lactato deshidrogenasa

Monika Paine

Peter Glickman

Principios de análisis.

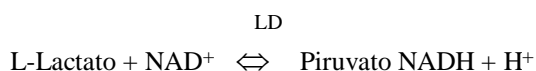
La deshidrogenasa láctica es una enzima presente en virtualmente todos los tejidos. Los incrementos de la enzima en el suero pueden indicar daños a un órgano o tejido. Sin embargo, los incrementos en la actividad total de la enzima son inespecíficos con respecto a su origen. Una información más específica puede ser obtenida con la medición de las cinco fracciones de isoenzima y la determinación de la contribución de cada isoenzima a la actividad total de LD.



El LD es un tetrámero compuesto de subunidades designadas como H (LD₁; H₄), M (LD₅; M₄), o una combinación de las subunidades de H (corazón) y M (músculo). Las isoenzimas de LD que contienen ambas subunidades H y M incluyen LD₂ (H₃M), LD₃ (H₂M₂), y LD₄ (HM₃). El método más común en uso para la separación y cuantificación de las 5 fracciones de isoenzimas de LD es la electroforesis. En algunos laboratorios, puede ser empleada solamente la determinación específica de la fracción de isoenzima LD₁.

La separación electroforética de isoenzimas de LD puede ser realizada utilizando agarosa o acetato de celulosa como medios de soporte (Tabla 31-8, método 1). El principio de separación electroforética de las isoenzimas de LD se basa en el hecho de que las cargas de las subunidades M y H difieren, y también en que cada fracción de isoenzima contiene una proporción diferente de las subunidades H y M. Por lo tanto, cuando una muestra que contiene LD es separada a un pH de aproximadamente 8.6, la LD₁, que tiene la carga negativa mayor, exhibe la mayor migración hacia el ánodo, mientras que la LD₅ migra hacia el cátodo. Las otras isoenzimas de LD migran secuencialmente a posiciones entre las fracciones LD₁ y LD₅.

Una vez separadas por electroforesis, puede ser determinadas las concentraciones relativas de cada una de las fracciones isoenzimáticas de LD utilizando técnicas colorimétricas o fluorométricas. Las determinaciones fluorométricas de las isoenzimas de LD pueden ser realizadas con el uso de un sustrato que contenga lactato y NAD mediante el cual el LD cataliza la siguiente reacción:



La intensidad relativa de NADH es proporcional a la actividad de LD de cada fracción de isoenzima y puede ser determinada a 340 nm. Se puede realizar la determinación visual de las fracciones individuales de las isoenzimas de LD acoplando la formación de NADH en la reacción descrita anteriormente a la reducción de cloruro de yodonitrotetrazolio (YNT) a un compuesto coloreado de formazán según se muestra a continuación:



La intensidad del compuesto de formazán que se forma está relacionada con la actividad de la LD. La intensidad relativa de cada una de las fracciones de isoenzima de LD puede ser determinada mediante el barrido electroforético del gel con un densitómetro.

El porcentaje relativo de actividad total de LD que está constituido únicamente por la fracción isoenzimática de LD₁ puede ser determinado con la utilización de métodos inmunoquímicos (Tabla 31-8, método 2). Estos procedimientos utilizan anticuerpos dirigidos contra la subunidad M de LD para inhibir la LD₂ a través las fracciones de la isoenzima LD₅ en forma selectiva. En el primer paso del procedimiento, el anticuerpo anti-M se une a la subunidad M o a las subunidades contenidas desde LD₂ hasta LD₅. Después de este paso inicial, puede utilizarse un anticuerpo dirigido contra el primer anticuerpo para remover aquellas enzimas que contienen una subunidad M, dejando la LD₁ en solución. El anticuerpo anti-M también puede unirse a una partícula insoluble. Esto permite que se remuevan por



centrifugación las isoenzimas LD que contienen M. En ambos procedimientos, la LD₁ que permanece en la solución puede determinarse por medio del procedimiento LD usual. La comparación de la actividad del LD presente en la muestra inicial comparada con la actividad remanente después de remover las isoenzimas de LD que contienen M, permite medir el porcentaje de LD₁ como una función de la actividad total del LD. Estos procedimientos inmunoquímicos para LD₁ pueden llevarse a cabo de una manera mucho más rápida comparados con la separación electroforética de las isoenzimas de LD.

Otros métodos para separar las isoenzimas de LD incluyen los procedimientos de intercambio aniónico.^{ref(1042)} Una muestra se coloca en una columna que contiene una resina de intercambio aniónico como la dietilaminoetil celulosa. A un pH de 8.0, LD₁ y LD₂ se unen a la resina con la mayor afinidad. Las isoenzimas de LD se extraen de la columna utilizando soluciones salinas de concentración creciente; la LD₅ se extrae primero y la LD₁ es eluida con mayores concentraciones de sal. Este método es tedioso y ocupa mucho tiempo, por lo que casi no se utiliza hoy en día.

Muestra.

La muestra que se prefiere es el suero. Este se debe separar de los eritrocitos tan pronto como sea posible para evitar la posibilidad de contaminación de la muestra de LD presente en las células. Los eritrocitos contienen aproximadamente 100 veces la cantidad de LD presente en el suero normal, siendo las fracciones isoenzimáticas de LD₁ y LD₂ las más predominantes. LD₄ y LD₂ son inestables a bajas temperaturas. Por lo tanto, las muestras deben conservarse a temperatura ambiente antes del análisis.

Intervalos de referencia.

Los intervalos de referencia para las fracciones isoenzimáticas de LD dependen de los medios de soporte utilizados para su separación y del método utilizado para la visualización. A continuación se presentan los intervalos de referencia sugeridos para la separación de la isoenzimas de LD utilizando electroforesis en gel de agarosa y visualización con colorante de tetrazolio.

FRACCIÓN DE ISOENZIMA	INTERVALO DE REFERENCIA (% relativo)
LD ₁	17-31
LD ₂	35-48
LD ₃	15-29
LD ₄	4-9
LD ₅	3-10

Los intervalos de referencia para la LD₁ que se miden por medio del procedimiento inmunoquímico, van de 0 a 102 U/L para LD₁ cuando la actividad de LD total es menor a 250 U/L. En pacientes con sospecha de un infarto agudo al miocardio pueden obtenerse los siguientes valores:

VALOR DE LD

VALOR DE LD₁



≤ 250 U/L
 ≥ 50 U/L

> 102 U/L
 $\geq 40\%$ de LD total

Procainamida y N-actilprocainamida

John E. Sherwin

Principios del análisis.

La medición de procainamida y su metabolito farmacológicamente activo, N-actilprocainamida (NAPA), es importante para monitorear su eficacia terapéutica y para evaluar el cumplimiento del paciente con el régimen de medicación. El fármaco se prescribe para utilizarse en pacientes con arritmia cardíaca.[ref\(1043\)](#)

La medición cuantitativa de procainamida y NAPA comprenden una variedad de técnicas. Los métodos colorimétricos[ref\(1044\)](#) y fluorométricos[ref\(1045\)](#) se utilizaban en el pasado y hoy en día sólo son de interés histórico. Estos métodos empleaban la extracción del fármaco seguido de la medición espectrofotométrica después de la reacción de diazoación o las determinaciones de fluorescencia a 354 nm tanto de procainamida como de NAPA.

Los procedimientos cromatográficos, entre ellos la cromatografía a gases (CG)[ref\(1046\)](#) y cromatografía de líquidos de alta eficacia,[ref\(1047\)](#) se han utilizado para medir estos fármacos. Una de las ventajas de estos procedimientos es que la procainamida y la NAPA pueden determinarse simultáneamente. Sin embargo, ambos procedimientos, especialmente la CG, se usan con cierta limitación en laboratorios hoy en día.

Los métodos más comunes en uso para la medición de procainamida y NAPA son los procedimientos de inmunoanálisis que comprenden el inmunoensayo de polarización de fluorescencia (IPF) (Tabla 31-9, método 1) y la técnica del inmunoensayo amplificado por enzima (TIAE) (Tabla 31-9, método 2). Las técnicas utilizadas tanto en los procedimientos de la IPF como la TIAE han sido previamente descritos (capítulo 13). La precisión del procedimiento de IPF generalmente es mucho mayor cuando se compara con los análisis que utilizan el TIAE.

Muestra.

Las muestras aceptables tanto para los procedimientos del TIAE como la IPF son el suero y el plasma. Sin embargo, la heparina no se recomienda para utilizarse con la IPF. Las muestras deben refrigerarse si el análisis se retrasa más de 8 horas después de colectarse. La procainamida y la NAPA pueden almacenarse hasta por dos semanas en el refrigerador. Las muestras que presenten una hemólisis severa, lipemia o ictericia no son aceptables debido a la interferencia con las mediciones fotométricas.

Intervalos de referencia.

El rango terapéutico más aceptado comúnmente para la procainamida es de 4 a 10 mg/mL. El rango inferior para la concentración sérica combinada de procainamida y NAPA es de aproximadamente 5 mg/mL, mientras que el límite máximo para la concentración total de suero es entre 20 a 30 mg/mL.[ref\(1048\)](#) Las concentraciones de procainamida mayores de 16 mg/mL se consideran tóxicas.



Agradecimientos

Agradecemos a los autores de la edición anterior para el método de las isoenzimas de creatina cinasa: Lawrence M. Silverman, John F. Chapman y Linda L. Woodard.

Referencias

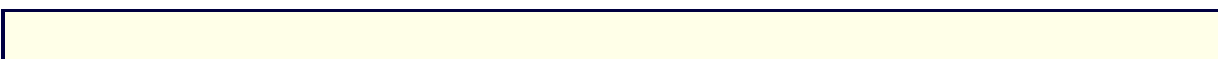
1. Hurst JW et al, editors: *The heart, arteries, and veins*, ed 6, New York, 1986, McGraw-Hill. Hearse DJ: *Enzymes in cardiology: diagnosis and research*, New York, 1979, Wiley & Sons.
2. Hearse DJ: *Enzymes in cardiology: Diagnosis and research*, New York, 1979, Wiley & Sons.
3. Wu ABW: Creatine kinase isoforms in ischemic heart disease, *Clin Chem* 35:7-13, 1989.
4. Puleo PR, Guadagno PA, Roberts R, et al: Early diagnosis of acute myocardial infarction based on assay for subforms of creatine kinase-MB, *Circulation* 82:759-764, 1990.
5. Christenson RH, Ohman EM, Clemmenson P, et al: Characteristics of creatine kinase-MB and the MB isoforms in serum after reperfusion in acute myocardial infarction, *Clin Chem* 35:2179-2185, 1989.
6. Mair J, Dienstl F, Puschendorf B: Cardiac troponin T in the diagnosis of myocardial injury, *Crit Rev Clin Lab Sci* 29:31-57, 1992.
7. Apple FS: Acute myocardial infarction and coronary reperfusion, *Am J Clin Pathol* 97:217-226, 1992.
8. Bodor GS, Porter S, Landt Y, Ladenson JH: Development of monoclonal antibodies for an assay of cardiac troponin-I and preliminary results in suspected cases of myocardial infarction, *Clin Chem* 38:2203-2214, 1992.
9. Stryer L: *Biochemistry*, ed 3, New York, 1988, WH Freeman & Company, pp 924-926.
10. Nolan AC, Clark WA, Karoski T, Zak R: Patterns of cellular injury in myocardial ischemia determined by monoclonal antimyosin, *Proc Natl Acad Sci* 80:6046-6050, 12. 1983.
11. Tears RD: Asymmetrical hypertrophy of the heart in young adults, *Br Heart J* 20:1-8, 1958.
12. Wigle ED: Hypercardiomyopathy, *Mod Concepts Cardiovasc Dis* 57:1-6, 1988.
13. Elstein E, Liew CC, Sole MJ: The genetic base of hypertrophic cardiomyopathy, *J Mol Cell Cardiol* 24:1471-1477, 1992.
14. Weiss LM, Liu XF, Chang KL, Billingham ME: Detection of enteroviral RNA in idiopathic dilated cardiomyopathy and other human cardiac tissues, *J Clin Invest* 90:156-159, 1992.
15. Chou TC: *Electrocardiography in clinical practice*, New York, 1979, Grune & Stratton.
16. Rouan GW, Lee TN, Cook EF, et al: Clinical characteristics and outcome of acute myocardial infarction in patients with initial normal or nonspecific electrocardiograms, *Am J Cardiol* 64:1087-1092, 1989.
17. Massie BM, Botvinick EH, Werner JA, et al: Myocardial scintigraphy with technetium-99m stannous pyrophosphate: an insensitive test for nontransmural myocardial infarction, *Am J Cardiol* 43:186-192, 1979.
18. Singh BN, Collett JT, Chew CYB: New perspectives in the pharmacologic therapy of cardiac arrhythmias, *Prog Cardiovasc Dis* 224:243-301, 1980.
19. Opie LH, editor: *Drugs for the heart*, ed 2, Orlando, 1987, Grune & Stratton.
20. Grenadier E, Keider S, Hahna L, et al: The rules of serum myoglobin, total CPK and CK-MB isoenzyme in the acute phase of myocardial infarction, *Am Heart J* 105:408-416, 1983.
21. Drexel H, Dworzak E, Kirchmair W, et al: Myoglobinuria in the early phase of acute myocardial infarction, *Am Heart J* 105:642-651, 1983.
22. Kagen L, Scheidt S, Butt A: Serum myoglobin in myocardial infarction: the "staccato phenomenon," *Am J Med* 62:86-92, 1977.
23. Guzy PM: Creatinine phosphokinase-MB (CPK-MB) and the diagnosis of myocardial infarction, *West J*



- Med* 127:445-460, 1977.
24. Lott JA, Stang JM: Serum enzymes and isoenzymes in the diagnosis and differential diagnosis of myocardial ischemia and necrosis, *Clin Chem* 26:1241-1250, 1980.
 25. Blomberg DJ, Kimber WD, Burkner MD: Creatine kinase isoenzymes: predictive value in the early diagnosis of myocardial infarction, *Am J Med* 59:464-469, 1975.
 26. Neufeld HN, Rabinowitz B, Clejan S, et al: Isoenzymes of creatine phosphokinase in acute myocardial infarction, *Angiology* 28:853-864, 1977.
 27. Mair J, Morandell D, Genser N, et al: Equivalent early sensitivities of myoglobin, creatine kinase MB mass, creatine kinase isoform ratios, and troponin I and T for acute myocardial infarction, *Clin Chem* 41:1266-1272, 1995.
 28. Irvin RG, Cobb FR, Roe CR: Acute myocardial infarction and creatine phosphokinase, *Arch Intern Med* 140:329-334, 1980.
 29. Hashimoto H, Abendschein DR, Strauss AW, et al: Early detection of myocardial infarction in conscious dogs by analysis of plasma MM creatine kinase isoforms, *Circulation* 71:363-368, 1985.
 30. Foxall CD: Changes in creatine kinase and its isoenzymes in human fetal muscle during development, *J Neurol Sci* 24:483-492, 1975.
 31. Galen RS, Gambino SR: *Beyond normality*, New York, 1975, Wiley & Sons.
 32. Hamm CW, Ravkilde J, Gerhardt W, et al: The prognostic value of serum troponin T in unstable, *N Engl J Med* 327:146-150, 1992.
 33. Katus HA, Tsunehiro Y, Gold HK, et al: Diagnosis of acute myocardial infarction by detection of circulating cardiac myosin light chains, *Am J Cardiol* 54:964-970, 1984.
 34. Mair J, Artner-Dworzak E, Lechleitner P, et al: Cardiac troponin T in diagnosis of acute myocardial infarction, *Clin Chem* 37:845-852, 1991.
 35. Horder M, Elser RC, Gerhardt W, et al: IFCC methods for the measurement of catalytic concentrations of enzymes. Part 7. IFCC method for creatine kinase (ATP:creatine N-phospho-transferase, EC 2.7.3.2): IFCC recommendation, *Clin Chim Acta* 190:S4-S17, 1990.
 36. Kuby SA, Noda L, Lardy HA: Adenosine triphosphate\Ncreatine transphorylase, *J Biol Chem* 209:191-201, 1954.
 37. Tanzer ML, Gilvarg C: Creatine and creatine kinase measurement, *J Biol Chem* 234:3201-3204, 1966.
 38. Oliver IT: A spectrophotometric method for the determination of creatine phosphokinase and myokinase, *Biochem J* 61:116-122, 1955.
 39. Rosalki SB: An improved procedure for serum creatine phosphokinase determination, *J Lab Clin Med* 69:696-705, 1967.
 40. Sax SM, Moore JS: Fluorometric measurement of creatine kinase activity, *Clin Chem* 11:951-958, 1965.
 41. Witteveen SAGJ, Sobel BE, DeLuca M: Kinetic properties of the isoenzymes of human creatine phosphokinase, *Proc Natl Acad Sci* 71:1384-1387, 1974.
 42. Lott JA, Heinz JW: Creatine kinase in serum. In Faulkner WR, Meites S, editors: *Selected methods for the small clinical chemistry laboratory*, Washington, D.C., 1982, American Association for Clinical Chemistry.
 43. Frank JJ, Bermes EW, Bickel MJ, Watkins BF: Effect of in vitro hemolysis on chemical values for serum, *Clin Chem* 24:1966-1970, 1978.
 44. Abbott LB, Lott JA: Reactivation of serum creatine kinase isoenzyme BB in patients with malignancies, *Clin Chem* 30:1861-1863, 1984.
 45. Morin LG: Creatine kinase: stability, inactivation, reactivation, *Clin Chem* 23:646-652, 1977.
 46. Henderson AR, McQueen MJ, Patten RL, et al: Testing for creatine kinase and creatine kinase-2 in Ontario: reference ranges and assay types, *Clin Chem* 38:1365-1370, 1992.
 47. Wong ET, Cobb C, Umehara MK, et al: Heterogeneity of serum creatine kinase activity among racial and gender groups of the population, *Am J Clin Pathol* 79:582-586, 1983.
 48. Foreback CC: Biochemical diagnosis of myocardial infarction, *Henry Ford Hosp Med J* 39:159-164, 1991.



49. Lee TH, Goldman L: Serum enzyme assays in the diagnosis of acute myocardial infarction, *Ann Intern Med* 105:221-233, 1986.
50. Brownlow K, Elevitch FR: Serum creatine phosphokinase isoenzyme (CPK2) in myositis: a report of six cases, *JAMA* 230:1141-1144, 1974.
51. El Allaf M, Chapelle J-P, El Allaf D, et al: Differentiating muscle damage from myocardial injury by means of the serum creatine kinase (CK) isoenzyme MB mass measurement/total CK activity ratio, *Clin Chem* 32:291-295, 1986.
52. Watson E, Kalman SM: Assay of digoxin in plasma by gas chromatography, *J Chromatogr* 56:209, 1971.
53. Bertler A, Redfors A: An improved method of estimating digoxin in human plasma, *Clin Pharmacol Ther* 11:665, 1970.
54. Butler VP Jr, Chen JP: Digoxin specific antibody, *Proc Natl Acad Sci* 57:71, 1967.
55. Henderson DR, Friedman SB, Harris JD, et al. CEDIATM, a new homogenous immunoassay system, *Clin Chem* 32:1637-1641, 1986.
56. Leflar CC, Freytag JW, Powell LM, et al: An automated, affinity-column mediated, enzyme-linked immunometric assay for digoxin on the DuPont aca discrete clinical analyzer, *Clin Chem* 30:1809-1811, 1984.
57. Morris RG, Frewin DB, Taylor WB, et al: The effect of renal and hepatic impairment and of spironolactone on digoxin immunoassays, *Eur J Clin Pharmacol* 34:233-239, 1988.
58. Ray JE, Crisan D, Howrie DL: Digoxin-like immunoreactivity in serum from neonates and infants reduced by centrifugal ultrafiltration and fluorescence polarization immunoassay, *Clin Chem* 37:94-98, 1991.
59. Lacarelle B, Durand A, Labadie N, Cano JP: Comparison of digoxin-like immunoreactive substance cross-reactivity with two digoxin automated immunoassays, *Ther Drug Monit* 11:725-727, 1989 [Letter].
60. Christenson RH, Studenberg SD, Beck-Davis S, Sedor FA: Digoxin-like immunoreactivity from serum by centrifugal ultrafiltration before fluorescence polarization immunoassay of digoxin, *Clin Chem* 33:606-608, 1987.
61. Pudek MR, Seccombe DW, Jacobson BE, Whitfield MF: Seven different immunoassay kits compared with respect to interference by a digoxin-like immunoreactive substance in serum from premature and full-term infants, *Clin Chem* 29:1972-1974, 1983.
62. Phelps SJ, Kamper CA, Bottorff MB, Alpert BS: Effect of age and serum creatinine on endogenous digoxin-like substances in infants and children, *J Pediatr* 110:136-139, 1987.
63. Wolach B, Carmi D, Shilo L, et al: Endogenous digoxin-like factor in neonates: effect of age and relation to serum bilirubin levels, *Acta Paediatr Scand* 78:364-368, 1989.
64. Howell BF, McClure S, Schaffer R: Lactate-to-pyruvate or pyruvate-to-lactate assay for lactate dehydrogenase: re-examination, *Clin Chem* 25:269-272, 1979.
65. Keiding R, Horder M, Gerhardt W, et al: Recommended methods for determination of four enzymes in blood, *Scand J Clin Lab Invest* 33:291-306, 1974.
66. Demetriou JA, Drewes PA, Gin JB: Enzymes. In Henry RJ, Cannon DC, Winkelman JW, editors: *Clinical chemistry: principles and techniques*, New York, 1974, Harper & Row.
67. Freer DE, Statland BE, Johnson M, Felton H: Reference values for selected enzyme activities and protein concentrations in serum and plasma derived from cord-blood specimens, *Clin Chem* 25:565-569, 1979.
68. Buhl SN, Jackson KY: Optimal conditions and comparison of lactate dehydrogenase catalysis of the lactate-to-pyruvate and pyruvate-to-lactate reactions in human serum at 25°, 30°, and 37° C, *Clin Chem* 24:828-831, 1978.
69. Mercer DW: Simultaneous separation of serum creatine kinase and lactate dehydrogenase isoenzymes by ion-exchange column chromatography, *Clin Chem* 21:1102, 1975.
70. Mercer DS: Improved column method for separating lactate dehydrogenase isoenzymes 1 and 2, *Clin Chem* 24:480, 1980.
71. Lima JJ, Lewis RP: Procainamide therapeutic use and serum concentration monitoring. In Taylor WJ, Finn AL, editors: *Individualizing drug therapy: practical applications of drug monitoring*, vol 3, New York,



- 1981, Gross Townsend Frank, Inc.
72. Koch-Weser J, Klein SW: Procainamide dosage schedules, plasma concentrations, and clinical effects, *JAMA* 215:1454-1460, 1971.
73. Ambler PK, Masarei JRL: A new fluorometric method for procainamide, *Clin Chem Acta* 70:379-383, 1976.
74. Matusik E, Gibson TP: Fluorometric assay for N-acetylpro-cainamide, *Clin Chem* 21:1899-1902, 1975.
75. Karbson E, Molin L, Norlander B, Sj`qvist B: Acetylation of procainamide in man studied with a new gas chromatographic method, *Br J Clin Pharmacol* 1:457-467, 1974.
76. Baselt R: *Analytical procedures for therapeutic drug monitoring and emergency toxicology*, Davis, California, 1980, Biomedical Publications.
77. Atkinson AJ Jr, Strong JM: Effect of active drug metabolites on plasma level-response correlations, *J Pharmacokinet Biopharm* 5:95-109, 1977.

Tablas

Tabla 31-1. Proteínas miofibrilares y su localización en el músculo esquelético vertebrado.

Proteínas	Localización	Cantidad de proteína como porcentaje de la proteína total celular
Proteínas contractiles		
Miosina	Banda A	60
Actina	Banda I	20
Proteínas reguladoras		
Tropomiosiona	Banda I	3
Troponina	Banda I	4.5
Proteína M	Línea M (banda M)	Menos de 1
Proteína C	Banda A	Menos de 1
Actinina	Línea Z, Banda I	1
Otras proteínas menores		
Connectina	Bandas A e I	Menos de 1
Proteína Z	Línea Z	Menos de 1
Desmina	Línea Z	Menos de 1

Tabla 31-2. Fármacos usuales en el tratamiento de enfermedades cardíacas.

Nombre:	Digoxina
Tipo:	Glucósido cardíaco
Modo de Actuar:	Aumenta la contractilidad; disminuye la conducción del impulso A-V
Comentarios:	Minimiza el rango terapéutico; larga vida media



		puede producir efectos tóxicos acumulativos; puede causar arritmias
Nombre:	Lidocaína	
Tipo:	Antiarrítmico	
Modo de Actuar:	Suprime las anormalidades ventriculares; atenúa la despolarización, la automaticidad, y la excitabilidad	
Comentarios:	Relativamente seguro sin efectos secundarios puede causar toxicidad cerebral.	
Nombre:	Quinidina	
Tipo:	Antiarrítmico	
Modo de Actuar:	Disminuye la excitabilidad miocárdica, la velocidad de conducción y la contractilidad	
Comentarios:	Administrada junto a la digoxina puede producir toxicidad; puede causar arritmias	

Tabla 31-3. Valores pronósticos positivos (PV+) y negativos (PV-) para la CC-MB sérica y el cambio ("vuelta") de la razón de LD con prevalencia variable en el infarto agudo al miocardio.
H

Frecuencia	Prueba					
	CC-MB*		LD"flip"H		Ambos I	
	PV+	PV-	PV+	PV-	PV+	PV-
50%	96	100	100	91	100	96
5%	51	100	100	99.5	100	99.7
*Sensibilidad = 100%; especificidad = 95%						
HSensibilidad = 90%; especificidad = 100%						
ISensibilidad = 95%; especificidad = 100%						

Tabla 31-4. Métodos de análisis de creatina cinasa

Método:	Oliver y Rosalki
	CC
Principio	Creatina fosfato+ ADP $\xrightarrow{\quad}$ Creatina + ATP ATP se une a la hexoKinasa y a las reacciones de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa para producir NADPH
Uso:	El más comúnmente utilizado
Comentarios:	Método Preferido Fácilmente automatizado

Tabla 31-5. Métodos para el análisis de la isoenzima creatina cinasa (CC).

Método:	Electroforesis
Principio:	A un pH 8.3, las isoenzimas tienen diferentes movilidades sobre 1% de agarosa; la actividad CC medida mediante análisis enzimático con un densitómetro.
Uso:	Anteriormente con frecuencia la técnica más utilizada; aún se utiliza con frecuencia.
Comentarios:	Separa todas las tres isoenzimas, las bandas aberrantes también se visualizan; tiempo lento de respuesta, se requiere de un volumen de muestra muy pequeño
Método:	Cromatografía con Intercambio de iones
Principio:	Separa las isoenzimas a través del uso de mini columnas, las isoenzimas de CC extraídas con NaCl
Uso:	Raramente se utilizan.
Comentarios:	Sujeto al efecto de dilución y contaminación de un CC-MM muy incrementado.
Método:	Inmunoinhibición
Principio:	La inmunoinhibición de las subunidades M unidas con anticuerpos policlonales y monoclonales; se mide el remanente de la actividad de la subunidad B
Uso:	No se utiliza con frecuencia para la detección precoz
Comentarios:	La CC-BB y CC-macro pueden interferir y dar resultados falso-positivos
Método:	Análisis de masa
Principio:	IRMA, un análisis tipo sandwich Los anticuerpos policlonales y monoclonales unidos al soporte sólido se unen a CC-MB. El segundo anticuerpo marcado con la enzima forma un complejo anticuerpo-CC-MB-anticuerpo
Uso:	Mayor frecuencia se utiliza para la detección precoz.
Comentarios:	Fácilmente automatizado, específico para la CC-MB; no experimenta interferencia por fármacos, hemolisis
IRMA, análisis inmunoradiométrico	

Tabla 31-6. Métodos de análisis de digoxina.

Método	Principio	Uso	Comentario
Radioinmunoanálisis ¹²⁵ I digoxina		Plasma o	El más sensible y

(RIA)	I-marcador y sin marcador en el suero del paciente compiten para fijarse al anticuerpo de antidigoxina	suero	exacto; requiere de un contador gamma
La polarización de fluorescencia (IPF)	Marcador fluoresceína y digoxina sin marcador en el suero del paciente compiten para fijarse al anticuerpo de antidigoxina. El nivel de polarización de la fluorescencia que se emite es inversamente proporcional a la concentración de digoxina del paciente.	Plasma o suero; el procedimiento más utilizado	La versión más antigua requería de una muestra antes del tratamiento, requiere de instrumentación especializada.
El inmunoanálisis de múltiples enzimas (TIAE)	Enlace competitivo para anticuerpos entre la digoxina endógena y la digoxina con marcador de enzima. Al enlazarse al anticuerpo a la digoxina con marcador de enzima inhibe la actividad enzimática	Suero; de uso frecuente	La versión antigua requería de una muestra antes del tratamiento; no tiene sensibilidad
La afinidad de la columna del inmunoanálisis	Libre y los complejos de digoxina enlazados al anticuerpo-enzima que se separan por cromatografía de afinidad. La cantidad de los complejos de digoxina enlazados en anticuerpos de enzima es directamente proporcional a las concentraciones de digoxina en el suero del paciente	Plasma o suero	No se requiere de una muestra antes del tratamiento; semi-automatizado

Tabla 31-7. Métodos de análisis de LD

Método:	Lactato a piruvato (L-P)
Principio:	$\text{L-Lactato} + \text{NAD} \xrightarrow{\text{pH 8.7}} \text{Piruvato} + \text{NADH}$ Producción de NADH monitoreado a 340 nm
Uso:	Automatizado



Comentarios: Análisis cinético; método de referencia sugerido	
Método:	Piruvato a lactato (P-L)
Principio:	$\text{Piruvato} + \text{NADH} \xrightarrow{\text{pH 7.0}} \text{L-Lactato} + \text{NAD}$ Desaparición de NADH monitoreado a 340 nm
Uso:	Automatizado Más comúnmente utilizado
Comentarios:	Una tasa de reacción más rápida que L-P
Método:	Tetrazolio
Principio:	$\text{L-Lactato} + \text{NAD} \xrightarrow{\text{LD}} \text{Piruvato} + \text{NADH}$ NADH reacciona con tinción de tetrazolio que forma tetrazolio reducido (coloreado)
Uso:	Manual
Comentarios:	Más frecuentemente utilizado para identificar las fracciones de la isoenzima LD después de la separación electroforética

Tabla 31-8. Métodos para medir las isoenzimas LD.

Método	Principio	Uso	Comentarios
Electroforesis	Las isoenzimas de LD que se separan sobre el gel de agarosa basándose en las diferentes movilidades a un pH 8.6. La cantidad de fracciones de la isoenzima de LD que se determina de manera densitométrica después de una visualización fluorométrica o colorimétrica	Más común	Separa todas las fracciones principales de la isoenzima; permite determinar las fracciones de LD atípicas
Inmunoquímicas	Las fracciones de LD inmunoquímicas que contienen las subunidades M, del LD ₂ a el LD ₅ , se remueven al utilizar anticuerpos	Frecuentemente utilizada	Solo se mide la fracción de LD ₁ . Es rápida y fácil de realizar



dobles o la
técnica de captura
de fase sólida

Tabla 31-9. Métodos de análisis para la procainamida y NAPA.

Método	Principio	Uso	Comentarios
Inmunoanálisis de polarización por fluorescencia (IPF)	Enlace efectivo del fármaco del paciente y el fármaco con marcador de fluoresceína-anticuerpo	Más común	Procainamida y NAPA determinado en análisis separados
Técnica de inmunoanálisis de enzimas múltiples (TIAE)	Enlace efectivo del fármaco del paciente y el fármaco con marcador de enzima al anticuerpo	Más frecuentemente utilizado	Procainamida y NAPA se determinan en diferentes análisis.

Figuras

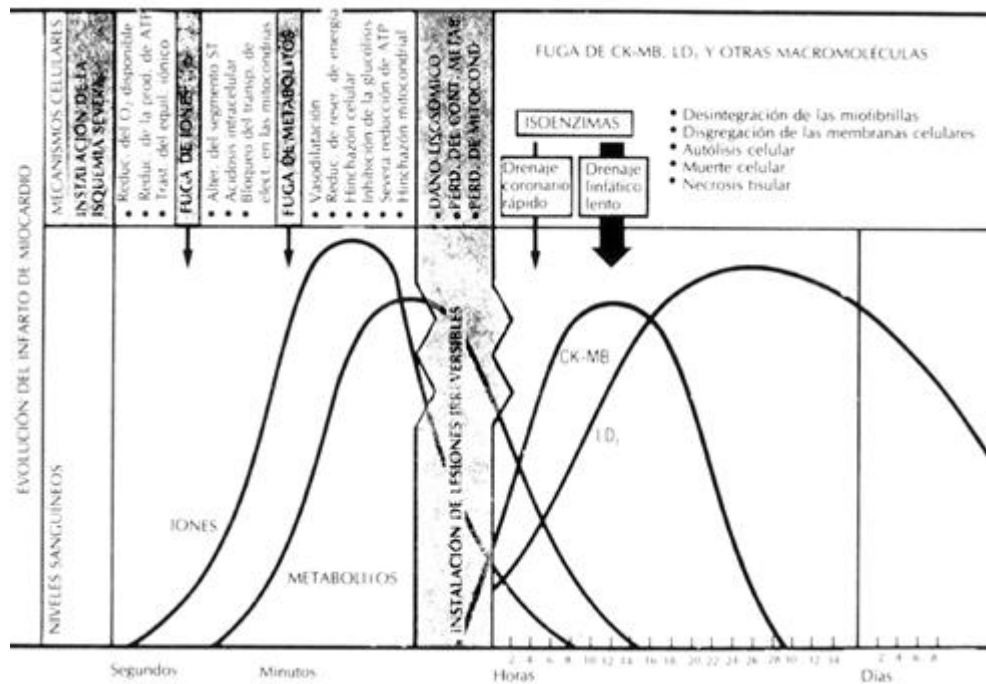


Figura 31-1 Evolución temporal de los cambios bioquímicos en un típico infarto agudo de miocardio (IAM) (Adaptado de Usategui-Gomez, M.: *Lab World* 32: 49-52, 1981)

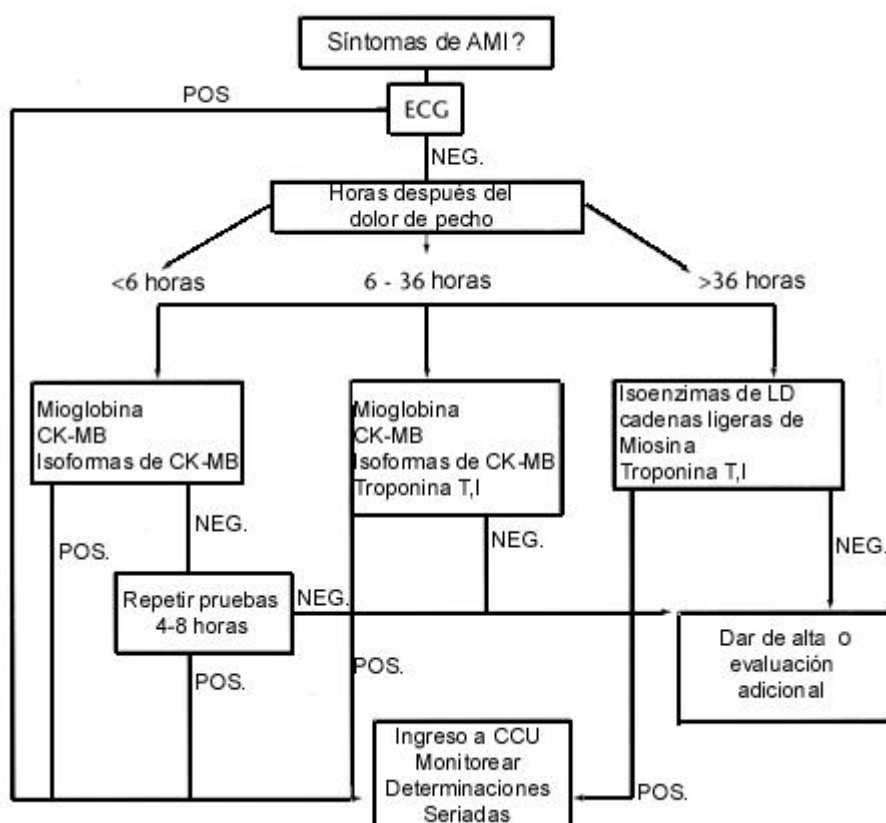


Figura 31-2 Algoritmo de pruebas de laboratorio para el manejo de pacientes con sospecha de infarto al miocardio. (Adaptado de Apple FS, Wu AH: Cardiac markers for diagnosis and monitoring therapy, *Clin Chem News* 19 [suppl.], 19193.

CAPÍTULO 32

32. Diabetes Mellitus

Richard F. Dods

Glucosa: propiedades y metabolismo

Definición

Función

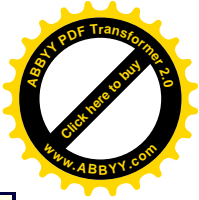
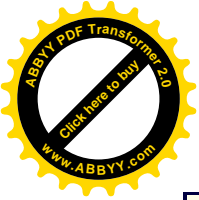
Transporte de glucosa a través de las membranas celulares

Vías metabólicas principales de la Glucosa-6-fosfato

Glucólisis aeróbica

Glucólisis anaeróbica

Glucogénesis, glucogenólisis y gluconeogénesis



Regulación hormonal del metabolismo de la glucosa

Metabolismo de la glucosa en la diabetes mellitus

Clasificación de la diabetes mellitus

- Diabetes Tipo I**
- Diabetes Tipo II**
- Diabetes secundaria**
- Tolerancia disminuida a la glucosa**
- Diabetes gestaciones**

Paragonaseis de la diabetes mellizas

- Epidemiología**
- Antígenos leucocitos humanos y diabetes mellizas**
- Virus**
- Defectos en los sitios del receptor**
- Resumen**

Complicaciones de la diabetes mellizas

- Recontarían**
- Neuropatía**
- Antipatía**
- Neuropatía**
- Infección**
- Hiperlipidemia y aterosclerosis**
- Cetoacidosis diabética (CAD)**
- Coma no cetósico hiperglucémico hiperosmolar**
- Hipoglucemia**
- Otras complicaciones de la diabetes**

Patogénesis de las complicaciones diabéticas

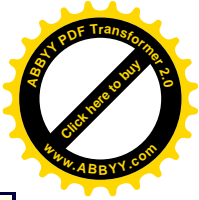
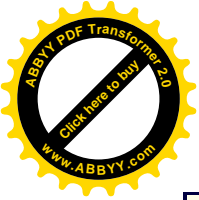
- Glucosilación proteica**
- Acumulación de sorbitol**

Tests funcionales

- Glucosa plasmática después de una comida**
- Prueba de Sullivan**
- Prueba de tolerancia a la glucosa oral**
- Prueba de tolerancia a la glucosa por vía intravenosa**

Cambio de compuesto analizado en la enfermedad

- Glucosa plasmática en el ayuno**
- Glucosa urinaria**
- Monitoreo personal u hospitalario, de la glucosa sanguínea**
- Hemoglobina glucosilada y albúmina plasmática**
- Insulina**
- Cetoácidos**



Proteína urinaria
Acido láctico
Ion hidrógeno (pH)
Electrolitos
Osmolalidad
Volumen de líquido corporal
Hiato aniónico
Nitrógeno de la urea sanguínea (BUN)
Lípidos

Métodos de análisis

Cetonas totales
Acido cetoacético
Acido Beta-hidroxibutírico
Glucosa
Hemoglobina glicada
Insulina y péptido C

OBJETIVOS

- ♦ Describir la homeostasis normal de glucosa
- ♦ Diferenciar entre la diabetes mellitus (tipos I y II), tolerancia disminuida a la glucosa y diabetes gestacional.
- ♦ Describir las complicaciones agudas y crónicas de la diabetes mellitus
- ♦ Enumerar los pasos a llevar a cabo en una prueba oral de tolerancia a la glucosa
- ♦ Establecer los niveles esperados de los siguientes analitos en la diabetes mellitus controlada I y II, en la cetoacidosis, y en el coma hiperosmolar: glucosa, cetonas, pH, bicarbonato, P_{CO_2} , insulina, péptido C, sodio, potasio, glicohemoglobina, BUN, osmolalidad y triglicéridos.

Términos Clave

acidosis láctica Acidosis (bajo pH sanguíneo) causado por exceso de ácido

acromegalia Exceso de hormona de crecimiento en los adultos y caracterizada por agrandamiento de los rasgos como en la cabeza, manos y pies.

adenosín 3',5'-monofosfato cíclico (cAMP) Una molécula orgánica que es imprescindible para la acción de las enzimas tales como las proteínas cinasas.

angiogénesis Una complicación de la diabetes mellitus. Proliferación anormal de los vasos sanguíneos en un tejido tal como las lentes del ojo.

angiopatía Una complicación de la diabetes mellitus que se manifiesta como un daño en las membranas basales de los vasos sanguíneos.

anorexia nerviosa Pérdida del apetito debido a razones psicológicas y que resulta en una disminución de la glucosa sanguínea.



anoxia Falta de oxígeno

anticuerpos de las células de los islotes (ACI) Anticuerpos frecuentemente encontrados en la diabetes tipo I que sugieren un origen autoinmune.

antígeno de histocompatibilidad (antígeno leucocitario humano, HLA)

Proteínas responsables por el rechazo de tejido transplantado a un individuo de otro individuo no emparentado. Los HLAs (como se conocen comúnmente por sus siglas en inglés) específicos están presentes en una alta frecuencia en personas que desarrollan ciertas enfermedades.

cetoacidosis diabética Una complicación de la diabetes mellitus caracterizada por hiperglucemia, hiperosmolaridad, pH bajo, cetonuria y cetonemia, y letargo o coma.

cetonemia Exceso en la sangre, de cetonas y de derivados de cetoácidos.

cetonuria Exceso en la orina, de cetonas y de cetoácidos derivados.

ciclo de los ácidos tricarboxílicos Vía metabólica que convierte a la glucosa-6-fosfato a través del ácido pirúvico en CO₂ y agua. Cuando se acopla a la fosforilación oxidativa, se forma adenosín trifosfato.

coma no cetósico heperglucémico hiperosmolar (CNHH) Una complicación de la diabetes mellitus caracterizada por hiperglucemia, heperosmolaridad, pH bajo, niveles normales de cetoácidos y letargo o coma.

diabetes gestacional Intolerancia a la glucosa que ocurre en algunos embarazos.

diabetes insípida Un desorden causado por una secreción excesiva de vasopresina arginina. Como en la diabetes mellitus, un síntoma característico de la diabetes insípida es la poliuria.

disacárido Dos monosacáridos ligados por una unión glucosídica.

fosforilación oxidativa El proceso que une el ciclo de los ácidos tricarboxílicos con la formación de ATP.

glucagón Una hormona producida por las células alfa del páncreas. El glucagón está principalmente involucrado en la liberación de energía.

glucagonoma Niveles excesivos de glucagón causados por un tumor.

glucólisis aeróbica Glucólisis que se encuentra ligada al ciclo de los ácidos tricarboxílicos por la presencia de oxígeno. La glucólisis aeróbica produce 36 moles de ATP por mol de glucosa

glucólisis anaeróbica Glucólisis que tiene lugar en la ausencia de oxígeno. En esta caso la glucólisis no se encuentra ligada al ciclo de los ácidos tricarboxílicos y solamente son producidos 2 moles de ATP por mol de glucosa.

gluconeogénesis Producción de glucosa a partir de ácido pirúvico

glucosa Un aldehído polihidroxílico de seis carbonos; fuente principal de energía en los organismos. Su metabolismo produce adenosín trifosfato.

glucosilación Reacción en la cual la glucosa se une covalentemente a la proteína.

glucosuria Cantidades excesivas de glucosa urinaria

hormona de crecimiento Hormona producida por la parte anterior de la



pituitaria. También llamada somatotropina. Aumenta la glucosa sanguínea.
islotes de Langerhans Grupo de células del páncreas compuesto por células alfa, las cuales segregan glucagón; células beta, que segregan insulina y las células delta, que segregan somatostatina.

lipólisis Hidrólisis de triglicéridos a ácidos grasos libres y glicerol.

membrana basal Una lámina de material no celular que cubre el epitelio

monosacárido Un aldehído o acetona polihidroxílico tal como la glucosa, fructosa o manosa.

nefropatía Una complicación de la diabetes mellitus atribuida al daño de los glomérulos y capilares asociados con el glomérulo.

neuropatía La complicación más común de la diabetes mellitus. Se refiere a las velocidades de conductancia nerviosa y motoras reducidas causadas por la degeneración y desmielinización axonal.

polidipsia Sed excesiva. Un síntoma de la diabetes mellitus.

polifagia Hambre constante. Un síntoma de la diabetes mellitus.

polisacárido Un carbohidrato compuesto de más de dos monosacáridos unidos por puentes glucosídicos.

poliuria Pérdida urinaria excesiva. Un síntoma de la diabetes mellitus.

preproinsulina Precursor de la proinsulina.

proinsulina Precursor de la insulina.

proteín cinasas Enzimas que fosforilan otras proteínas. Algunas proteínas cinasas dependen de la actividad del adenosín monofosfato.

retinopatía Una complicación de la diabetes mellitus. Un desorden de la retina causado en la diabetes por la formación de catarata o por la proliferación de pequeños vasos sanguíneos (angiogénesis).

siroxina Una hormona producida por la glándula tiroides que aumenta los niveles de glucosa en sangre.

sitios de receptores Los sitios dentro o fuera de las células en donde se unen las hormonas. La unión de la hormona al sitio del receptor es el paso inicial para la acción hormonal.

somatostatina Una hormona producida en las células delta del páncreas. Inhibe la secreción de insulina y glucagón.

somatostatinoma Un tumor que produce exceso de cantidades de somatostatina, lo que resulta en hiperglucemia.

vía del ácido urónico Convierte a la glucosa-6-fosfato en ácido glucorónico.

vía de la hexosa monofosfato Vía metabólica en la cual la glucosa-6-fosfato se metaboliza a ribosa y dióxido de carbono.

Las complicaciones que surgen de la diabetes mellitus constituyen la tercera causa de muerte atribuible a esta enfermedad en los Estados Unidos de acuerdo a las estadísticas recopiladas por la Comisión Nacional de Diabetes. [ref\(1049\)](#) Un examen del Grupo Nacional de Datos sobre Diabetes [ref\(1050\)](#) estima que la incidencia de la diabetes en la población americana es del 6.6%. Es así que existen aproximadamente 16.5 millones de americanos diabéticos. De

este número solamente se diagnosticaron el 50%. Las proporciones son similares en relación al sexo y son mayores en los negros que en los blancos. El costo de la diabetes a la economía americana excede los 5000 millones de dólares anuales.

Las implicaciones de la diabetes se extienden más allá de sus efectos directos y de las complicaciones a largo plazo, ya que muy bien se ha establecido que la diabetes es un factor de riesgo para la enfermedad coronaria del corazón^{ref(1051)} y la enfermedad cerebrovascular (infarto).^{ref(1052)} Un diabético presenta un riesgo dos veces mayor de sufrir infarto de miocardio que un no-diabético de la misma edad y sexo.

La investigación ha demostrado que la diabetes mellitus no es una enfermedad única sino un conjunto de enfermedades que muestran un síntoma común, la incapacidad de un individuo de tolerar la glucosa (intolerancia a la glucosa).

Los síntomas principales de la diabetes mellitus son los niveles anormalmente altos de glucosa sanguínea y urinaria (hiperglucemia y glucosuria respectivamente), poliuria, sed excesiva (polidipsia), hambre constante (polifagia), pérdida repentina del peso y, durante los episodios agudos de la diabetes mellitus, exceso de cetonas en la sangre y en la orina (cetonemia y cetonuria, respectivamente). Todos estos síntomas son el resultado de la incapacidad para metabolizar la glucosa y las consecuencias de niveles elevados de glucosa.

Glucosa: Propiedades y Metabolismo

Definición (ver también pág. 1052).

Los carbohidratos se definen como aldehydos y cetonas polihidroxílicos (aldosas y cetosas, respectivamente). Los carbohidratos simples como la glucosa se denominan monosacáridos. Dos monosacáridos ligados por un puente llamado glucosídico forma un disacárido. Más de dos monosacáridos unidos por puentes glucosídicos se denomina polisacárido. Los carbohidratos de la dieta consisten de monosacáridos tales como la glucosa, fructosa y galactosa; de disacáridos tales como la sacarosa, lactosa y maltosa y de polisacáridos tales como el almidón. Las enzimas intestinales convierten a los disacáridos y polisacáridos en monosacáridos (ver p. 574).

Función

La principal función bioquímica de la glucosa es la de proporcionar energía para los procesos de la vida. El *adenosín trifosfato* ("ATP") es la fuente de energía universal para las reacciones biológicas. La oxidación de la glucosa por las vías glucolítica y del ácido cítrico es la fuente principal de energía para la biosíntesis del ATP.

Transporte de glucosa a través de las membranas celulares

La finalidad principal en el metabolismo de la glucosa es el transporte facilitado de glucosa a través de la membrana plasmática. Se han identificado cinco transportadores de glucosa, llamados GluT-1 hasta el GluT-5. Los transportadores de glucosa son componentes integrales de la membrana celular y son glucoproteínas con pesos moleculares de aproximadamente 55000 daltones.

Los transportadores de glucosa varían con respecto a la distribución tisular y a la constante aparente de Michaelis-Menten (K_m). GluT-1, GluT-3 y GluT-5 poseen un K_m bajo

desde un valor menor que 1 a 2 mM, mientras que GluT-4 tiene un K_m intermedio de 5mM, y el GluT-2 un alto K_m de 17mM. Existe una considerable significación sobre las localizaciones de las diferentes formas de los transportadores de glucosa. GluT-1 y GluT-3, localizados predominantemente en las células insulino-dependientes, sensibles a la glucosa, tales como el cerebro y eritrocitos, permiten la entrada de glucosa a la célula a niveles por debajo del rango normal de ayuno a pesar de los niveles bajos de insulina y glucosa. El transportador de glucosa con el mayor valor de K_m , GluT-2, se localiza en las células que están involucradas directamente en la regulación de la glucosa sanguínea y permite que estas células aumenten su entrada de glucosa, independiente de la insulina, en presencia de niveles altos de glucosa sanguínea. Es así que las células del intestino, del túbulo renal y del hígado y las células beta pancreáticas poseen GluT-2. Los transportadores con valores de K_m altos permiten la entrada de glucosa por encima de un amplio rango de niveles de glucosa extracelular. El GluT-4, el cual tiene un K_m de rango intermedio, se encuentra principalmente en las células musculares insulino dependientes y en las adiposas.

Vías metabólicas principales de la glucosa-6-fosfato

Dentro de la célula, la glucosa es convertida rápidamente en *glucosa-6-fosfato* (G6P), un intermediario muy importante en el metabolismo de la glucosa. La enzima que cataliza la fosforilación de la glucosa por el ATP es la hexocinasa (o glucocinasa en el hígado y las células beta del páncreas). La glucocinasa puede jugar un rol clave en la regulación de la homeostasis de la glucosa manteniendo un gradiente del transporte de glucosa en los hepatocitos. [ref\(1053\)](#)

Como se muestra en la Fig. 32-1, la glucosa-6-fosfato sirve como punto de partida para cinco vías metabólicas. La glucosa-6-fosfato es convertida por medio de la glicólisis en piruvato, una sustancia que es más tarde metabolizada por el ciclo de los ácidos tricarboxílicos hasta anhídrido carbónico y agua. La glucosa-6-fosfato es también oxidada por la vía hexosa monofosfato a ribosa y anhídrido carbónico, convertida a ácido glucorónico por la vía del ácido glucorónico, e incorporada al glucógeno por la glucogénesis.

Glucólisis aeróbica

Glucólisis.

El metabolismo de la glucosa-6-fosfato por la vía glucolítica (también llamada *vía de Embden-Meyerhof*) resulta en la formación de ATP (Fig. 32-2). La glucólisis convierte una molécula de glucosa de seis carbonos en dos moléculas de un compuesto de tres carbonos denominado ácido pirúvico. Este proceso produce 2 moles de ATP por mol de glucosa. Un aspecto importante de la glucólisis es la formación de ácido pirúvico. En la glucólisis aeróbica, el piruvato es posteriormente metabolizado por medio del ciclo de los ácidos tricarboxílicos.

Ciclo de los ácidos tricarboxílicos.

El ácido pirúvico entra al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (ciclo del ácido cítrico, ciclo de Krebs) donde es metabolizado a anhídrido carbónico y agua. La Fig. 32-3 muestra los pasos intermedios en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y los pasos que son usados para reducir el nicotinamida adenindinucleótido (NAD) y el flavinadenín dinucleótido (FAD) a sus



correspondientes análogos, El NADH y el FADH₂. El ciclo de los ácidos tricarboxílicos no produce directamente ATP, pero el ATP es producido por la oxidación del NADH y del FADH₂.

Fosforilación oxidativa.

La fosforilación oxidativa es un proceso complejo que tiene lugar en la mitocondria y que involucra una transferencia de electrones desde el NADH y el FADH₂ hasta una serie de compuestos, eventualmente terminando con la reducción del oxígeno para producir una molécula de agua. De esta manera lo que realmente produce ATP, es la reoxidación del NADH y del FADH₂, compuestos producidos por el ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Contrario a la glucólisis que produce 2 moles de ATP por mol de glucosa, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos ligado a la fosforilación oxidativa produce 36 moles de ATP por mol de glucosa. Los procesos oxidativos y de síntesis de ATP están fuertemente acoplados debido a que la disponibilidad de adenosín difosfato (ADP) controla la velocidad de la oxidación y la disponibilidad de oxígeno regula la velocidad de la fosforilación.

Glucólisis anaeróbica

En el músculo fatigado en donde existe una deficiencia de oxígeno, o *anoxia*, la glucosa convertida por medio de la glucólisis a ácido pirúvico no puede ser metabolizada por las vías anteriores. En su lugar (Fig. 32-2) el piruvato es convertido a lactato por la enzima lactato deshidrogenasa. A esto se le denomina *glucólisis anaeróbica*. A diferencia de la glucólisis aeróbica, solamente 2 moles de ATP por mol de glucosa son producidos por glucólisis anaeróbica. El ácido láctico producido por el tejido anóxico es llevado por la circulación al hígado, en donde es reconvertido a glucosa en un proceso llamado gluconeogénesis (ver el texto siguiente).

Fuentes alternativas de energía.

Como se indica en la Fig. 32-3 los aminoácidos y los ácidos grasos también entran al ciclo de los ácidos tricarboxílicos para producir ATP y son, por lo tanto, fuentes alternativas de energía.

Glucogénesis, glucogenólisis y gluconeogénesis

Glucógeno.

El exceso de glucosa es almacenado en las células como el polímero glucógeno para demandas posteriores de energía. El glucógeno (Fig. 32-4) es un polisacárido de alto peso molecular compuesto enteramente de unidades de glucosa en uniones 1,4 glucosídicas con ramificaciones 1,6 que tienen lugar cada 10 unidades aproximadamente. El glucógeno está localizado en el citoplasma del hígado y de las células musculares en gránulos que contienen las enzimas que involucran la síntesis (glucogénesis) y la hidrólisis (glucogenólisis) del glucógeno. Referirse nuevamente a la Fig. 32-1 para ver cómo es que la glucogénesis y la glucogenólisis se adecúan al esquema general del metabolismo de la glucosa. La Fig. 32-5 presenta una representación simplificada de la glucogénesis y de la glucogenólisis.

Glucogénesis.

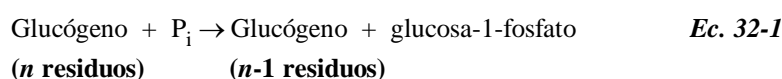
El primer paso en la glucogénesis es la conversión de la glucosa-6-fosfato a

glucosa-1-fosfato (Fig. 32-5). La reacción de la glucosa-1-fosfato con el uridín-5-trifosfato produce uridín difosfato glucosa, una sustancia que reacciona con la molécula de glucógeno preexistente para formar uniones glucosídicas 1,4. La síntesis de las uniones glucosídicas 1,4 es catalizada por la enzima *glucógeno sintetasa*. La glucógeno sintetasa existe en dos formas: la forma fosforilada inactiva de la enzima y la forma desfosforilada activa de la enzima. La fosforilación de la enzima activa se realiza por cualquiera de las varias enzimas de la clase *proteín cinasas*. Las proteínas cinasas son activadas por bajos niveles de adenosín 3',5'-monofosfato cíclico (cAMP). De esta manera, la actividad de la glucógeno sintetasa (y por lo tanto la glucogénesis) es regulada por los niveles de cAMP intracelular. La glucogénesis es favorecida por los bajos niveles de cAMP e inhibidos por los altos niveles de cAMP: los niveles de cAMP son a su vez regulados por la insulina, la cual causa disminución de los niveles de cAMP.

La ramificación del glucógeno es llevada a cabo por una enzima denominada *enzima ramificante*. Esta enzima ramificante hidroliza la unión glucosídica 1,4 del glucógeno para formar de cinco a seis fragmentos de unidades de glucosa, los cuales son fijados a la molécula de glucógeno a través de uniones 1,6.

Glucogenólisis.

Aun cuando la glucogenólisis (Fig. 32-5) es opuesta a la glucogénesis, no ocurre simplemente con una simple reversión de cada paso de la glucogénesis pero sí por un único sistema enzimático. La *enzima desramificante* separa trisacáridos de las ramificaciones y los vuelve a fijar por uniones glucosídicas 1,4 a las terminaciones de la molécula de glucógeno. La *glucógeno fosforilasa* hidroliza la unión glucosídica 1,4 produciendo glucosa-1-fosfato:



De la misma manera que la glucógeno sintetasa, la fosforilasa de glucógeno existe en dos formas. La forma activa, llamada fosforilasa a, es un tetrámero. La forma inactiva, la fosforilasa b, es un dímero. La forma activa se forma en tres pasos: la fosforilación del dímero por una proteína cinasa llamada *fosforilasa cinasa* seguida de la unión del dímero fosforilado con otro dímero fosforilado. El tercer y último paso en el proceso de activación es la unión de una molécula de piridoxal fosfato a cada subunidad del tetrámero. La fosforilasa cinasa es activada por el cAMP. Note que los altos niveles celulares de cAMP favorecen la glucogenólisis por encima de la glucogénesis. La activación de la fosforilasa de glucógeno está bajo control hormonal (ver abajo).

Gluconeogénesis.

Los pasos en la gluconeogénesis se muestran en la Fig. 32-6. La gluconeogénesis produce glucosa-6-fosfato a partir de aminoácidos, ácidos grasos, glicerol, y lactato. El piruvato es un intermediario importante en la gluconeogénesis (Fig. 32-6), ya que puede formarse directamente a partir de la oxidación de lactato (por la lactato deshidrogenasa) y a partir del aminoácido alanina (vía la transaminación por la alanina transaminasa). El glicerol, derivado de la hidrólisis de triglicérido (lipólisis) entra la vía gluconeogénica después del piruvato, como glicerol-3-fosfato. Estas tres sustancias, lactato, alanina, y glicerol, son los

precusores principales para la síntesis de glucosa. La gluconeogénesis no es una simple reversión de la glucólisis, aun cuando la gluconeogénesis comparte algunas de las enzimas de la vía glucolítica. La glucosa se forma solamente en el hígado y en el riñón, los cuales poseen la enzima glucosa-6-fosfatasa, que hidroliza la G6P a glucosa. De hecho, el hígado es la fuente no dietética más importante de la glucosa sérica del cuerpo y es un punto crítico en la manutención de los niveles de glucosa sanguínea.

Regulación hormonal del metabolismo de la glucosa^{ref(1054)}

El sistema para regular los niveles de glucosa sanguínea es ideado para lograr dos fines. El primero es para almacenar glucosa en exceso en relación a las necesidades corporales inmediatas en un reservorio compacto (glucógeno), y el segundo es para movilizar la glucosa almacenada de manera de mantener el nivel de glucosa sanguínea. La regulación de la glucosa sanguínea es esencial para mantener al cerebro, cuya fuente energética primaria es la glucosa, abastecido por una cantidad constante de glucosa. El rol de la insulina es desviar la glucosa extracelular a los sitios de almacenamiento intracelular en la forma de macromoléculas (como el glucógeno, lípidos y proteínas). Es así que la glucosa es almacenada en tiempos de abundancia para los momentos de necesidad.

En respuesta a la baja glucosa en sangre, como en períodos de ayuno, una serie de agentes hiperglucemiantes actúa en las vías metabólicas intermediarias para formar glucosa a partir de las macromoléculas almacenadas. De esta forma las proteínas y el glucógeno son metabolizados para formar glucosa-6-fosfato (gluconeogénesis), la cual es hidrolizada a glucosa en el hígado, y liberada a la sangre para mantener los niveles de glucosa sanguínea.

Los agentes hiperglucemiantes más importantes son el glucagón, la epinefrina, el cortisol, la tiroxina, la hormona de crecimiento, y ciertas hormonas intestinales. El comportamiento de cada uno de estos agentes es diferente en la regulación de la glucosa sanguínea; mientras que la insulina favorece el metabolismo anabólico (síntesis de macromoléculas), estas hormonas, en parte, inducen el metabolismo catabólico para romper grandes moléculas.

Insulina.

La insulina es sintetizada en el páncreas exocrino por las células beta de los islotes de Langerhans como un precursor de elevado peso molecular llamado preproinsulina.^{ref(1055)} La preproinsulina (11500 daltones) se muestra en la Fig. 32-7. La ruptura en la unión marcada por una flecha rotulada 1, resulta en la formación de la proinsulina (9000 D). La proinsulina presenta solamente el 5% de la actividad de insulina. La molécula de proinsulina consiste en las cadenas A y B de la insulina conectadas por puentes disulfuro y por un péptido conectivo llamado *péptido C*. Durante el proceso el péptido C (3000 D) es removido a partir de la molécula por ruptura de las uniones marcadas por las flechas 2 y 3. La molécula de insulina resultante (6000 D) consiste de dos cadenas A y B conectadas por dos puentes disulfuro. Todo este proceso tiene lugar en la célula beta. La síntesis inicial de la preproinsulina tiene lugar en el aparato de Golgi. La molécula es empaquetada en una vesícula denominada un *gránulo beta*. La primera ruptura a proinsulina y la siguiente a insulina tienen lugar dentro del gránulo. Cantidades iguales del péptido C y de insulina son liberados dentro de la circulación cuando el gránulo es disuelto en la membrana plasmática de la célula beta después de un estímulo neural, dietético o hormonal. Solamente pequeñas cantidades de proinsulina son



encontradas en la circulación.

Glucagón y cortisol.

El glucagón es una hormona polipeptídica de 3599 daltones que es sintetizada por las células alfa del páncreas.^{ref(1056)} En la diabetes mellitus, debido a la deficiencia de insulina, los niveles de glucagón se elevan y no son suprimidos por la alta concentración de carbohidratos.^{ref(1057)}

El cortisol y los otros corticoesteroides adrenales aumentan la velocidad de la gluconeogénesis a partir de la proteína y de los aminoácidos, especialmente en el hígado.

Epinefrina.

La epinefrina aumenta los niveles de glucosa por inhibición de la secreción de insulina, estimulando la secreción de glucagón, así como la glucogenólisis, e inhibiendo la gluconeogénesis.

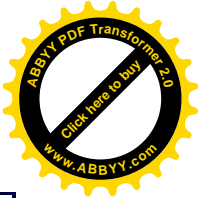
Otras hormonas.

La *hormona de crecimiento* y la *tiroxina* también actúan para elevar los niveles de glucosa circulante. La *somatostatina* es una hormona polipeptídica que es sintetizada principalmente en las células delta del páncreas. La somatostatina inhibe la liberación tanto de la insulina como del glucagón. El *polipéptido inhibidor gástrico* estimula la liberación de la insulina. Esta hormona se encuentra localizada en la mucosa intestinal, y su liberación es estimulada por la glucosa y los aminoácidos. Así, la ingestión de alimento resulta en niveles aumentados de insulina circulante. Los factores de crecimiento de tipo insulina son proteínas con homología estructural a la proinsulina y a la somatomedina C. Estos factores pueden jugar un rol en el control de la glucosa.

Acciones opuestas de la insulina y del glucagón.

La insulina y el glucagón poseen efectos opuestos. La insulina inhibe la proteólisis, lipólisis, gluconeogénesis y la glucogenólisis en el hígado; aumenta la síntesis proteica en el músculo; y acelera la síntesis de triglicéridos en las células adiposas (ver el cuadro). La insulina actúa como el único agente corporal hipoglucémico. Una comida rica en carbohidratos induce la secreción de insulina y suprime la liberación de glucagón. La hipoglucemia estimula la liberación de glucagón. De esta forma, en general, la insulina y el glucagón actúan opuestamente entre sí, la insulina promoviendo el almacenamiento de energía y el glucagón promoviendo la liberación de energía. El resultado neto, del agente hipoglucémico (insulina) y de los agentes hiperglucémicos, es la homeostasis de la glucosa.

Acción Metabólica de la Insulina		
Tejido		
Hígado	Adiposo	Músculo
Glucogenólisis	Lipólisis	Ruptura de proteína



Inhibe:	Gluconeogénesis Cetogénesis	Liberación de aminoácidos
Estimula:	Síntesis de glicógeno y de ácidos grasos	Síntesis de glicerol y de ácidos grasos
		Absorción y metabolismo de la glucosa
		Absorción de aminoácidos
		Síntesis de proteínas
		Glucogénesis

Metabolismo de la glucosa en la diabetes mellitus

Procesos metabólicos en el individuo normal.

La regulación hormonal de los niveles de glucosa sanguínea y de los procesos metabólicos es anormal en el diabético y resulta en el signo clásico de diabetes mellitus: niveles elevados de glucosa sanguínea.

En el estado de postabsorción (ayuno) de los individuos normales, la relación insulina/glucagón sanguínea es baja, haciendo que el glucógeno muscular y hepático sea degradado como una fuente de glucosa. Un ayuno adicional resulta en la degradación de las proteínas a aminoácidos en el músculo esquelético, y en la lipólisis de los triglicéridos a ácidos grasos en el tejido adiposo. El aminoácido alanina y el glicerol son usados para sintetizar glucosa por medio de la gluconeogénesis estimulada por glucagón. Además, los ácidos grasos libres pueden ser usados como combustible por el corazón, los músculos esqueléticos y el hígado.

Algunos minutos después de la ingesta de una comida, los niveles de insulina sanguínea aumentan. La glucosa y los aminoácidos de la dieta tales como la leucina, isoleucina y lisina, son estimulantes potentes de las células beta del páncreas haciendo que éstas segreguen insulina. La mayor parte de las células periféricas responden al aumento de la glucosa sanguínea con un aumento rápido del transporte de la glucosa dentro de las células. De esta manera, los niveles de glucosa sanguínea aumentan solamente de un 20% a un 40% en los individuos no-diabéticos. Sin embargo, aproximadamente el 80% de la entrada de glucosa *no* es insulino dependiente, ya que el cerebro, los glóbulos rojos, el hígado y los intestinos no requieren de insulina para la entrada creciente de glucosa cuando está presente glucosa sanguínea elevada. El músculo es el tejido dependiente de insulina más importante. Los niveles crecientes de insulina y glucosa sanguíneas inhiben la lipólisis así como a aproximadamente el 60% de la liberación normal de glucosa hepática.

Procesos metabólicos en el diabético.[ref\(1058\)](#)

En el diabético, tanto la producción como el metabolismo de la glucosa están aumentados. De esta forma, en el estado de ayuno, la liberación de glucosa hepática está muy elevada, presentando un diagnóstico de hiperglicemia de ayuno de la diabetes.

Además, tanto la liberación de insulina (diabetes tipo I) como la respuesta celular a la insulina (resistencia a la insulina en la diabetes tipo II, ver abajo) están disminuídas en los diabéticos, especialmente cuando se relacionan con un nivel dado de glucosa sanguínea. El control reducido de la insulina hace que el diabético se encuentre en un estado



semihambriento, con una mayor dependencia de los triglicéridos como una fuente de combustible y de proteína como fuente de precursores de glucosa. De esta manera, en el estado de ayuno, el diabético puede tener elevados las cetonas y los ácidos grasos sanguíneos (ver p. 625).

Después de una comida, la inhibición de la salida de glucosa hepática es mucho menor en el diabético. Combinado tanto con la insulina disminuida como con la resistencia a la insulina, esto resulta en un aumento anormal y prolongado de la glucosa sanguínea en el diabético después de una comida (ver Fig. 32-8).

En resumen, el metabolismo de los carbohidratos en un diabético es sorprendentemente similar al de un no diabético en el estado de ayuno. En ambos casos, el metabolismo de los ácidos grasos ha reemplazado al metabolismo de la glucosa-6-fosfato como la principal fuente de energía para la célula.

Clasificación de la Diabetes Mellitus

En 1979 el Grupo Nacional de datos de Diabetes del Instituto Nacional para la Salud (NIH, por sus siglas en inglés) desarrolló un esquema de clasificación para la diabetes mellitus y otros tipos de intolerancia a la glucosa basado en el conocimiento corriente de la bioquímica de esta enfermedad. [ref\(1059\)](#) La Tabla 32-1 resume el sistema de clasificación del NIH.

Diabetes Tipo I

La diabetes tipo I, o la diabetes mellitus insulino dependiente (DMID), afecta a más de 2 millones de americanos. Su incidencia es de 1 cada 300 personas menores de 20 años de edad, momento en que esta enfermedad es generalmente diagnosticada. Este tipo de diabetes es causada por una secreción insuficiente de insulina (insulinopenia). Son necesarias inyecciones de insulina para mantener el metabolismo normal de la glucosa. Los individuos con la diabetes de tipo I son especialmente propensos a cetoacidosis. La *cetoacidosis* se refiere a la formación excesiva de cetoácidos y al pH sanguíneo bajo (acidosis). Esta condición se discute en la pág. 625. Otras complicaciones de tipo I incluyen cataratas, enfermedades de los nervios (neuropatía), enfermedad del riñón (nefropatía), y enfermedades de los vasos sanguíneos (angiopatía).

Diabetes Tipo II

La diabetes tipo II, diabetes mellitus no insulino dependiente (DMNID), no presenta correlación con los niveles sanguíneos de insulina. La diabetes tipo II afecta a casi 10 millones de americanos. Su aparición es generalmente después de los 40 años de edad. El individuo tipo II no depende por lo general de la inyección de insulina, es menos propenso a cetoacidosis, y es, a menudo, obeso.

Diabetes secundaria

La diabetes mellitus causada bajo otras condiciones y enfermedades se llama diabetes secundaria. La diabetes secundaria puede ser causada por enfermedad pancreática,



acromegalia (exceso de la hormona de crecimiento), el síndrome de Cushing (cortisol elevado), feocromocitoma (catecolaminas elevadas), glucagonoma (glucagón excesivo debido a un tumor), somatostatina (somatostatina excesiva debida a un tumor), aldosteronismo primario, enfermedad severa del hígado, y administración de ciertas drogas, hormonas y productos químicos.

Tolerancia disminuida a la glucosa

La tolerancia disminuida a la glucosa (TDG) incluye a personas que han tenido una prueba de tolerancia anormal a la glucosa pero no una hiperglucemia evidente. La prueba de glucosa oral se discute más adelante en este capítulo. Las estimaciones del rango de incidencia están comprendidas entre el 4.6% y el 11.2%.[ref\(1060\)](#)

Diabetes gestacional

La diabetes gestacional se refiere a la diabetes que ocurre temporalmente durante el embarazo. Un estudio[ref\(1061\)](#) estima que el 39% de las mujeres con diabetes gestacional manifiestan la diabetes mellitus tipo II 20 años después de la concepción. Una práctica que se ha tornado ampliamente aceptada ha sido el rastreo de diabetes gestacional en mujeres embarazadas con hiperglucemia maternal.

Patogénesis de la Diabetes Mellitus[ref\(1062\)](#)

Epidemiología

Los epidemiólogos han estudiado gemelos idénticos y descendientes y hermanos de los diabéticos. [refs\(1063\)](#) Estos estudios demuestran claramente que la diabetes mellitus se desarrolla a partir de una compleja interacción entre factores ambientales y genéticos. Si el desarrollo de la diabetes fuera determinada solamente por los factores hereditarios, la enfermedad debería afectar siempre a ambos gemelos idénticos. Tres estudios diferentes muestran que cuando tiene lugar la diabetes de tipo I en un gemelo, la aparición subsiguiente en el otro aparece solamente en el 50% de las veces. Por otro lado, el desarrollo de la diabetes de tipo II en un gemelo presagia su aparición en el otro prácticamente el 100% de las veces.

Los estudios sobre la descendencia de padres diabéticos de tipo II muestran que la diabetes es transmitida a la descendencia con solamente una frecuencia del 6% al 10%. Se estima que la incidencia de la diabetes tipo II en la población americana en general es alrededor del 2%. Sin embargo, existe una propensión a la diabetes en la descendencia ya que del 25% al 40% de ellos presentan resultados anormales de la prueba de tolerancia a la glucosa. Resultados similares han sido obtenidos utilizando como sujetos a los hermanos de los diabéticos.

Las principales conclusiones derivadas de estos estudios son las siguientes:

1. Los descendientes y los hermanos de los diabéticos son más propensos a desarrollar diabetes que aquellos de los no-diabéticos.
2. La descendencia de dos diabéticos son más propensos a desarrollar diabetes que una descendencia de solamente uno de los padres diabético.

3. Las frecuencias de diabetes menores que las esperadas en gemelos idénticos y en la descendencia y hermanos de diabéticos sugieren la importancia de los factores ambientales en la expresión del componente genético para la diabetes.
4. Se postula un segundo hecho que ocurre al comienzo de la vida como generador de la diabetes de tipo I en individuos genéticamente susceptibles. Este hecho es probable que sea una infección viral o un disturbio en el sistema inmune. La diabetes tipo II tiene lugar sin que exista tal hecho aun cuando su expresión se encuentre modulada por factores tales como la obesidad.
5. Generalmente se transmite el mismo tipo de diabetes. Por ejemplo, los hermanos diabéticos y la descendencia de la diabetes tipo I son generalmente diabéticos tipo I.
6. La herencia juega un papel más importante en el desarrollo de la diabetes de tipo II que en la diabetes de tipo I.

Antígenos leucocitarios humanos y diabetes mellitus

La susceptibilidad o resistencia hereditaria a la diabetes mellitus de tipo I está basada en los estudios que asocian la producción de los antígenos leucocitarios humano específicos (HLAs) con la existencia de la enfermedad. Los HLAs son proteínas diméricas producidas por el complejo mayor de histocompatibilidad en el cromosoma 6. Los loci HLA *clase II* hace tiempo identificados por susceptibilidad a la diabetes tipo I son DP, DQ, y DR. Los HLAs DR3 o los DR4, o ambos tipos, tienen lugar en el 90% de los diabéticos tipo I. La resistencia a la diabetes tipo I está asociada con DR2.^{ref(1064)} Recientemente fue determinado que la susceptibilidad a la diabetes tipo I era mayor cuando la proteína DR4 era producida junto con una proteína generada por el locus DQ, llamado DQw3.2.

El alelo DQw3.2. tiene una frecuencia génica de 35.7% en la diabetes tipo I en contraste con el 10.1% en los no-diabéticos. Los individuos que poseen el alelo DQw3.1. son menos propensos a adquirir la diabetes tipo I que sus contrapartes DQw3.2.^{ref(1065)} La susceptibilidad a la diabetes tipo I se encuentra aumentada cuando las cadenas beta de DQ no presentan el ácido aspártico en la posición 57 y la cadena alfa DQ presenta arginina en la posición 52.^{ref(1066)}

La causa autoinmune para la diabetes mellitus tipo I ha sido sugerida por observaciones de la infiltración linfocítica progresiva de las células de los islotes del páncreas con destrucción concomitante de la célula beta y la aparición de anticuerpos en los componentes de las células del islote antes de la manifestación evidente de la diabetes.

Se le ha asignado un rol en la diabetes para las células T a través de estudios en los que la diabetes era inducida en ratas y ratones no-diabéticos recipientes para la transferencia de células T CD4 y CD8 a partir de animales diabéticos.^{ref(1067)}

Virus

Las infecciones virales han sido consideradas durante largo tiempo como los factores iniciadores de la causa autoinmune de la diabetes tipo I. Los estudios epidemiológicos informan una incidencia estacional para la diabetes de tipo I ^{refs(1068)} y correlacionan la existencia



de las infecciones virales tales como las paperas y el sarampión con el desarrollo subsiguiente de este tipo de diabetes. [ref\(1069\)](#)

Evidencia posterior de la infección viral como una causa de la diabetes de tipo I surge de los estudios con coxsackievirus B4. La evidencia directa de que este virus causa la diabetes en los humanos se deriva del aislamiento del coxsackievirus B4 del páncreas de un niño que había desarrollado cetoacidosis diabética inmediatamente después de la aparición de una infección viral. [ref\(1070\)](#) El niño murió de la enfermedad, y la autopsia mostró destrucción completa de las células beta. La inyección del virus en ratones producía diabetes. A partir de los informes de los coxsackievirus B4, los virus de las paperas, los coxsackievirus B1 y el reovirus de la rubeola tipo 3 han estado implicados en la transmisión de la diabetes tipo I. [ref\(1071\)](#)

Defectos en los sitios del receptor

Proteínas receptoras de la insulina.

La insulina se une reversiblemente a los sitios en las membranas celulares. Los sitios de unión para la insulina (llamados sitios receptores) se encuentran solamente en ciertos tipos de células (células del hígado, monocitos, adipocitos y músculo). El sitio receptor de insulina está compuesto de dos moléculas glucoproteicas. [ref\(1072\)](#) Una subunidad es una proteína-quinasa tirosina específica. [ref\(1073\)](#) La unión de la insulina al sitio receptor desencadena una serie de eventos que resultan en un aumento de la permeabilidad de la membrana celular para la glucosa y los aminoácidos, en alteración de las actividades enzimáticas y en la promoción de la biosíntesis proteica.

Resistencia a la insulina.

En la diabetes tipo II, la hiperglucemia se encuentra a menudo asociada a la *hiperinsulinemia*. Esto está en fuerte contraposición a la diabetes de tipo I en la cual la hiperglucemia está siempre asociada a la *deficiencia* de insulina. De hecho, mientras que la diabetes de tipo I depende de la insulina para mantener la glucosa sanguínea normal, la diabetes de tipo II responde a dosis de insulina relativamente altas con solamente pequeñas reducciones en los niveles de glucosa sanguínea. La diabetes tipo II se dice que es insulino resistente. Aun cuando la entrada de glucosa a la célula aumenta en respuesta a la concentración elevada de glucosa en la diabetes de tipo II, es baja en relación tanto a los niveles de glucosa sanguínea como a los de insulina. La resistencia a la insulina en la diabetes de tipo II está relacionada directamente con un número reducido de receptores a la insulina. [ref\(1074\)](#) La diabetes causada por el número reducido de sitios receptores para insulina se denomina *diabetes tipo A*. La diabetes tipo A ocurre en las personas obesas. Los individuos obesos muestran un aumento significativo en el número de sitios de unión para insulina y una disminución de los síntomas de la diabetes cuando se les administra una dieta baja en carbohidratos. [ref\(1075\)](#) La diabetes tipo A en las personas obesas puede derivar directamente de la dieta rica en carbohidratos más que de la obesidad en sí.

Anticuerpos para el receptor.

Se ha informado de la presencia de anticuerpos circulantes para el receptor de la insulina. [ref\(1076\)](#) La diabetes tipo II causada por dichos anticuerpos para los sitios receptores de insulina se denomina *diabetes tipo B*. La diabetes tipo B generalmente presenta síntomas de desórdenes autoinmunes tales como anticuerpos antinucleares, artralgia y aumento de la



glándula paratiroides. La diabetes tipo B tiene una incidencia menor que la de tipo A.

Transporte alterado de la glucosa.

El transporte de la glucosa está reducido en ambos tipos de diabetes, tipo I y tipo II, debido a los niveles significativamente bajos de la proteína de transporte de glucosa con elevado K_m , GluT-2.^{ref(1077)} El defecto resultante parece ser una baja expresión del mRNA para la GluT-2. El efecto de esta anomalía de transporte es una reducción de la respuesta a la insulina a niveles elevados de glucosa. Esto agrava, posteriormente, la condición diabética.

Resumen

Es probable que la diabetes mellitus de tipo I sea causada más comúnmente por destrucción de las células islotes que resultan de una respuesta autoinmune a una infección viral, mientras que la mayoría de los casos de diabetes de tipo II son causados por defectos en el sitio receptor ya que reducen el número de sitios de unión para la insulina o afectan los procesos después de la fijación de la insulina. Otras causas de diabetes descritas en esta sección son probablemente raras (<10%).

Complicaciones de la Diabetes Mellitus^{refs(1078)}

Las complicaciones principales de la diabetes mellitus son la retinopatía, neuropatía, angiopatía, nefropatía, susceptibilidad a la infección, hiperlipidemia, cetoacidosis y coma no-cetósico heperglicémico hiperosmolar (CNHH). Con la única excepción de CNHH, estas complicaciones diabéticas ocurren más frecuentemente para los diabéticos tipo I que para los diabéticos tipo II.

Retinopatía

Las áreas opacas en las lentes del ojo son llamadas cataratas. La formación de catarata es la principal retinopatía de la diabetes. La retinopatía es también causada por la proliferación de vasos sanguíneos pequeños en las lentes.

Neuropatía^{ref(1079)}

La neuropatía es la complicación más común de la diabetes mellitus. Es aparente en alrededor del 25% de los diabéticos y es reconocida por una variedad de síntomas que incluyen dolor, adormecimiento, sensaciones de picazón o quemadura en las extremidades, vértigo y visión doble. Estos síntomas son causados por las velocidades reducidas de la conducción nerviosa motora y sensorial provocadas por la degeneración de desmielinización axonal. Las manifestaciones secundarias de neuropatía incluyen paro cardíaco, transpiración excesiva e impotencia masculina.

Angiopatía

La angiopatía se refiere al daño de los ligamentos (membranas basales) de los vasos sanguíneos. La angiopatía aumenta el riesgo de enfermedad coronaria cardíaca y de paro cardíaco y puede conducir a retinopatía y nefropatía.

Nefropatía

La nefropatía se refiere al daño del glomérulo (aparato de filtración del nefrón) y de los capilares asociados con el glomérulo. El daño capilar es causado por angiopatía. El resultado es una reducción en la capacidad de filtración de los riñones. La proteinuria es, a menudo, el primer signo de la nefropatía diabética. Aproximadamente del 25% al 30% de los individuos tratados por falla renal de estado final son diabéticos.

Infección

Los diabéticos son altamente susceptibles a infección, ulceración y gangrena (especialmente en las extremidades). Los desórdenes de la piel son también más comunes en los diabéticos que en los no-diabéticos.

Hiperlipidemia y aterosclerosis

Los niveles elevados de triglicéridos y colesterol están a menudo asociados con la diabetes de tipo II.^{[ref\(1080\)](#)} Se han reportado niveles aumentados de lipoproteína de muy baja densidad (VLDL) para la diabetes de tipo II.^{[ref\(1081\)](#)} Se ha informado que la lipoproteína de alta densidad (HDL) es significativamente más baja en los diabéticos que en los no-diabéticos.^{[ref\(1082\)](#)} Estos resultados son consistentes con la alta incidencia de la enfermedad coronaria del corazón en los diabéticos y una sobrevivencia baja para los diabéticos con infarto de miocardio.^{[ref\(1083\)](#)}

Citoacidosis diabética ("CAD")

Metabolismo de los cetoácidos.

Como se muestra en la Fig. 32-9, la acetil coenzima A (Acetil CoA) es un punto de encuentro para el metabolismo de la glucosa, proteínas y lípidos. Entra ya sea el ciclo del ácido tricarboxílico o es metabolizada a 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG CoA). La HMG CoA puede ser metabolizada a colesterol, o puede ser convertida a acetoacetato. El acetoacetato presenta dos transformaciones posibles, descarboxilación espontánea a acetona (en los pulmones) o reducción enzimática a beta-hidroxibutirato. El acetoacetato y el beta-hidroxibutirato se denominan comúnmente *cetoácidos* o *cuerpos cetónicos*. Los cetoácidos constituyen normalmente una fuente de energía para el cerebro, los riñones y el músculo cardíaco. Una cantidad considerable de acetoacetato y de beta-hidroxibutirato es excretada por los riñones con pérdida concomitante de sodio y potasio. La excreción renal de sodio y potasio resulta en la retención de iones hidrógeno.

Cetoácidos e insulina.

En los no-diabéticos la formación de cetoácido es una vía secundaria. En la insulinopenia de los diabéticos tipo I las células adiposas movilizan ácidos grasos de los triglicéridos. La degradación de ácidos grasos aumenta a medida que se torna la fuente más importante de energía de la célula. El catabolismo creciente de los ácidos grasos produce cantidades excesivas de acetil CoA. Aun cuando una porción significativa de la acetil CoA está disponible para entrar al ciclo de los ácidos tricarboxílicos para producir energía, una cantidad en exceso de acetil CoA es metabolizada para producir niveles anormales de cetoácidos (cetosis). La producción aumentada de ceto ácidos consume bicarbonato y por lo tanto baja el pH sanguíneo (acidosis). Este mismo patrón metabólico tiene lugar en estado de

hambruna excepto que ocurre hipoglucemia en lugar de hiperglucemia.

Diagnóstico de la cetoacidosis.

Los gases de la sangre y la glucosa sanguínea son útiles en detectar la cetoacidosis diabética. Bajo pH, P_{CO_2} normal, bicarbonato bajo, hiato aniónico alto, y glucosa elevada sugieren cetoacidosis descompensada. El pH bajo, P_{CO_2} bajo, bicarbonato bajo, un alto hiato aniónico y elevada glucosa sugieren una cetoacidosis diabética parcialmente compensada. El hiato aniónico elevado es causado por la acumulación de cetoácidos (sales sódicas).

Acidosis láctica.

La acidosis láctica es causada por la acumulación de ácido láctico resultante de una hipoxia tisular (deficiencia de oxígeno). De la misma manera que la acumulación de cetoácidos, la acumulación de lactato produce iones hidrógenos sanguíneos aumentados y por lo tanto pH bajo. En el diabético, la acidosis láctica a menudo tiene lugar simultáneamente con la cetoacidosis diabética, especialmente si el pH decae por debajo de 7.10, si ocurre insuficiencia renal o si se suministran ciertos agentes hipoglicémicos tales como la fenformina (DBI).

Coma no-cetósico hiperglicémico hiperosmolar

El coma no-cetósico hiperglicémico hiperosmolar (CNHH) ha sido reportado cada vez con mayor frecuencia en los últimos años. Se caracteriza por un nivel de glucosa sanguínea por encima de 6000 mg/L, pH sanguíneo normal o ligeramente bajo, osmolalidad sérica por encima de 350 mOsm/Kg, niveles normales de cetoácidos, y letargo o coma. Aun cuando la cetoacidosis diabética tiene lugar principalmente en los diabéticos de tipo I, el CNHH ocurre principalmente en los diabéticos de tipo II. La ausencia de cetoácidos en el CNHH es causada probablemente por la sensibilidad preferencial del metabolismo de los lípidos y de la glucosa por la insulina. La lipólisis es inhibida por un décimo del nivel de insulina que se requiere para favorecer el metabolismo de la glucosa.^{ref(1084)} En los diabéticos de tipo I, la insulinopenia favorece la lipólisis resultando en la acumulación de cetoácidos y en el bloqueo de la utilización de la glucosa, lo que produce hiperglucemia. En los diabéticos de tipo II, aun cuando existe resistencia a la insulina, hay suficiente actividad de insulina como para limitar la lipólisis y así la producción de cetoácidos pero actividad de insulina insuficiente como para evitar la hiperglucemia. El CNHH a menudo aparece en momentos de estrés o en enfermedades severas.

Hipoglucemia

La hipoglucemia causa numerosos problemas neurogénicos, desde el coma moderado hasta el grave, ataque y muerte. El nivel de la glucosa sanguínea varía cuando los síntomas son obvios pero tenderán a ser <500 mg/L para los adultos y <400 mg/L para los recién nacidos. Este desorden potencialmente amenazador de la vida, es a menudo el resultado del tratamiento de la hiperglucemia con insulina, generalmente debido a un mal manejo. Sin embargo, el uso agresivo del tratamiento con insulina para mantener la normoglucemia puede aumentar mucho el riesgo de la hipoglucemia.^{ref(1085)}

Existen otras varias causas de hipoglucemia^{ref(1086)} que se encuentran citadas en el



cuadro siguiente. Muchas de ellas son detectadas en los casos de emergencia como el coma, tratables simplemente con glucosa intravenosa. El diagnóstico diferencial puede requerir medida de la glucosa sanguínea, insulina y péptido C. El péptido C es importante en el diagnóstico del tratamiento ilegal o por sobredosis de la insulina, porque las preparaciones comerciales de insulina no contienen péptido C.^{ref(1087)} En estos casos, aun cuando los niveles de insulina sanguínea son elevados, los niveles de péptido C son bajos. La producción de anticuerpos contra insulina pueden también resultar en un patrón similar, aunque estos casos se encuentran a menudo asociados con la hiperglucemia postprandial.

El riesgo de contraer una hipoglucemia es mayor para los pacientes hospitalizados. Este riesgo no está a menudo relacionado con la diabetes pero se encuentra asociado con enfermedad avanzada del hígado, insuficiencia renal y malnutrición. Dichos pacientes severamente enfermos tendrán alta mortalidad.

Causas de Hipoglucemia en el Ayuno
Insulina sanguínea reducida/producción disminuida de glucosa
Enfermedad del hígado
Alcoholismo
Insuficiencia renal
Galactosemia y enfermedad de almacenamiento de glucógeno
Malignidad (aumenta el consumo de glucosa o la producción del factor de crecimiento insulino dependiente)
Infección
Embarazo tardío
Malnutrición
Tratamiento con sobredosis de insulina
Insulinoma
Tratamiento artificial (exógeno) con insulina
Tratamiento con drogas sulfonilurea
Anticuerpos anti-insulina

Otras complicaciones de la diabetes

El diabético agudamente enfermo, con cetoacidosis o coma hiperosmolar, se halla en riesgo de contraer inmediatamente complicaciones amenazantes para la vida. La hipovolemia asociada con estas enfermedades agudas puede resultar en shock y falla renal. El edema cerebral puede aumentar en pacientes con cetoacidosis y coma hiperosmolar como resultado de la administración de insulina y líquido. La pérdida de sales generalmente ocurre en CAD y CNHH. Aun cuando los electrolitos del suero de los pacientes pueden estar elevados, normales o bajos, generalmente presentan déficit del potasio corporal.

Efecto de la diabetes en el feto.

El feto de una diabética embarazada está expuesto a grandes riesgos de contraer complicaciones adversas que resultan directamente de la hiperglucemia. Estos incluyen aborto espontáneo,^{[ref\(1088\)](#)} defectos de nacimiento, y macrosomía.^{[ref\(1089\)](#)} El riesgo de presentar estas complicaciones está directamente relacionado con el grado de hiperglucemia maternal y puede reducirse si se obliga a cumplir con el control glucémico, especialmente durante las primeras semanas del embarazo.^{[refs\(1090\)](#)}

Patogénesis de las Complicaciones Diabéticas

Glucosilación proteica

La glucosilación proteica no-enzimática ocurre comúnmente en los glóbulos rojos, los glomérulos, y las células nerviosas así como en otros tejidos. El desarrollo de la glucosilación es proporcional a las concentraciones extracelulares de glucosa. Tal glucosilación tiene lugar por el mecanismo mostrado para la glucosilación de la hemoglobina (ver p. 630). Los grupos funcionales carbonilo de la glucosa y de otros azúcares reaccionan con los grupo amino libres de las proteínas para formar intermediarios llamados *bases de Schiff*, o *aldiminas*. El grupo amino que reacciona es o un grupo amino N-terminal o un grupo amino epsilon lisina. La aldimina subsecuentemente se rearregla para formar cetamina. Este arreglo se denomina rearreglo de Amadori. La aldimina es lábil; puede hidrolizarse rápidamente para volver a formar un grupo amino y un grupo carbonilo libres. La cetamina es relativamente estable y su formación no es reversible.

Se sabe que la glucosilación excesiva produce alteraciones significativas en las propiedades físicas y químicas de una proteína. Por ejemplo, la glucosilación de la cristalina alfa, una proteína que existe en las lentes del ojo, reduce profundamente su solubilidad. Se ha demostrado que la hiperglucemia en ratas aumenta la glucosilación de la cristalina-alfa simultáneamente con la formación de catarata.^{[ref\(1091\)](#)} Se sabe que la glucosilación de la membrana basal de los vasos sanguíneos causa engrosamiento de la membrana similar a lo encontrado en la mayoría, o mejor, en todos los diabéticos.^{[ref\(1092\)](#)} Las alteraciones funcionales de la inmunoglobulina G (IgG) por glucosilación no-enzimática se ha informado^{[ref\(1093\)](#)} que están asociadas a un aumento de la susceptibilidad a infección.

Basado en estos y otros hallazgos, se ha propuesto una hipótesis para establecer que muchas de las complicaciones de los diabéticos son causadas por glucosilación de proteínas específicas tales como la cristalina-alfa, IgG, y la proteína de la membrana basal, lo cual dificulta su función y resulta en una enfermedad tal como la nefropatía diabética.^{[refs\(1094\)](#)}

Acumulación de sorbitol

La acumulación intracelular de sorbitol es la base para otra hipótesis propuesta para explicar las complicaciones diabéticas.^{[ref\(1095\)](#)} La aldosa reductasa reduce la glucosa a sorbitol, el cual a su vez es oxidado a fructosa por la sorbitol deshidrogenasa. El sorbitol no cruza fácilmente las membranas celulares. La remoción del sorbitol de las células depende de su conversión a fructosa, la cual no atraviesa libremente la membrana celular. Sin embargo, cuando los niveles de glucosa son altos, las cantidades de sorbitol producido favorece la habilidad de la célula para convertir el sorbitol en fructosa, resultando en la acumulación intracelular de sorbitol. La acumulación intracelular de cetonas, glucosa, y sorbitol causa turgencia osmótica y ruptura de las estructuras celulares. Solamente son afectadas las células que no dependen de la insulina



para el transporte de glucosa a través de la membrana plasmática. Estas células incluyen el nervio, las lentes oculares y las células glomerulares. Este efecto osmótico es la causa del edema cerebral amenazante para la vida que tiene lugar durante el tratamiento para CAD y CNHH. La disminución de la osmolalidad sanguínea después del tratamiento puede aumentar el desvío del agua extracelular en las células cerebrales. El apoyo para esta hipótesis son los informes sobre los aumentos de los niveles de sorbitol y fructosa en las células nerviosas y en las lentes oculares de los diabéticos. El apoyo más profundo para esta hipótesis deriva de los estudios que utilizan inhibidores de la aldosa reductasa. Se ha reportado que los inhibidores de la aldosa reductasa, sorbinol y tolrestat mejoran la conducción nerviosa en las ratas diabéticas^{ref(1096)} y en los humanos diabéticos.

Pruebas Funcionales

Glucosa plasmática postprandial

La diabetes se detecta más fácilmente cuando se comprueba la capacidad metabólica para los carbohidratos. Esto se puede llevar a cabo sometiendo el sistema con una carga definida de glucosa. La medida de la velocidad con que la sangre se carga de glucosa a medida que se compara con la velocidad con que se clarifica de glucosa en las personas saludables, detecta un mal funcionamiento del metabolismo de la glucosa. Una comida con gran contenido en carbohidratos se usa a menudo como carga de carbohidratos, aunque una bebida con 75g de glucosa es preferida a una comida. Se denomina prueba *postprandial*.

La sangre se extrae a las 2 horas después de la ingestión de una comida o de bebida con glucosa. Los niveles de glucosa por encima de los 1400 mg/L son anormales; los niveles de 1200 a 1400 mg/L son ambiguos; y los niveles por debajo de 1200 mg/L son normales. La prueba de glucosa postprandial, aunque ampliamente utilizado para la detección de la diabetes, es muy inexacto debido a las numerosas variables que son difíciles de controlar o ajustar. Estas variables incluyen la edad, el peso, la dieta previa, actividad, enfermedad, medicaciones, momento del día que se lleva a cabo la prueba, y concentración real de la dosis de glucosa. Cuando una comida es utilizada como carga, la carga efectiva de glucosa depende de la digestión de los disacáridos y de los polisacáridos y de su posterior absorción en el tracto intestinal.

Prueba de Sullivan

La prueba de Sullivan se utiliza frecuentemente para detectar la diabetes gestacional. Una carga de 50g de glucosa se da a un paciente en ayunas. La sangre se retira a la hora. Se considera que existe diabetes gestacional cuando los niveles de glucosa plasmática se encuentran por encima de los 1500 mg/L (encima de 1300 mg/L) para la sangre total.

Prueba de tolerancia a la glucosa oral

La prueba de tolerancia a la glucosa oral (PTGO, por sus siglas en inglés) evalúa la limpieza de glucosa de la circulación después de una ingestión de glucosa bajo condiciones definidas y controladas. La prueba ha sido estandarizado por el Comité de Estadística de la Asociación Americana de Diabetes.^{ref(1097)}

Las condiciones standard requieren una ingesta mínima de carbohidratos de 150g/día durante 3 días antes de la prueba. Un consumo diario de carbohidratos menor que esto baja la intolerancia a la glucosa. Debería de realizarse un ayuno de 8 a 16 horas antes de la prueba.



El paciente debe estar en movimiento ya que la inactividad disminuye la tolerancia a la glucosa. Sin embargo, el ejercicio y el estrés emocional deberían evitarse.

La enfermedad reduce la tolerancia a la glucosa. También interfieren las anormalidades de hormonas como la tiroxina, la hormona de crecimiento, el cortisol y las catecolaminas. Ciertas sustancias también interfieren como las drogas y los medicamentos como los anticonceptivos orales, los salicilatos, el ácido nicotínico (encontrado en los cigarrillos, cigarros, tabaco en pipa, tabaco para mascar), diuréticos (incluyendo la cafeína), y los agentes hipoglucémicos (insulina, sulfonilureas). El momento de la prueba afecta influye en ésta. El mejor momento para conducir la prueba es entre las 7 am y el mediodía. Los criterios de evaluación también deberían ser ajustados por edad. Si no se realizan los ajustes por edad, alrededor del 80% de las personas por encima de los 60 años de edad serán considerados diabéticos.[ref\(1098\)](#)

La carga de glucosa debe consistir solamente de glucosa. Algunas preparaciones comerciales rotulaban “100 gramos de equivalentes de glucosa” contienen disacáridos y polisacáridos. La velocidad con que estos sacáridos son hidrolizados y absorbidos por el tracto intestinal varía de persona a persona. Dicha preparación no es obviamente recomendable para individuos con desórdenes pancreáticos o de mal absorción. La concentración de la carga es de 40 g de glucosa por metro cuadrado por área corporal. Para la mayoría de los individuos 75g de glucosa total es suficiente. La bebida puede ser saborizada si no se utiliza cafeína o teofilina.

Las muestras de sangre son extraídas en ayuno y 1, 2 y 3 horas después de la ingestión de glucosa. Muestras adicionales a la media hora, una hora y media y dos horas después de una ingestión de glucosa son útiles y algunas veces necesarias para la evaluación de la prueba.

El PTGO se evalúa comúnmente por varios sistemas alternativos de puntaje. Todos utilizan criterios basados en el método de la glucosa oxidasa para la cuantificación de la glucosa plasmática. Los valores de glucosa plasmática son convertidos a los valores sanguíneos totales por medio del uso de la ecuación siguiente:

$$\text{Glucosa (sangre total, en mg/L)} = \text{Glucosa (plasma, en mg/L)} \times 1.15 + 6\text{mg/L}$$

Los criterios para el sistema de Wilkerson Point, el sistema de Fajans-Conn, el Programa Universitario del Grupo de Diabetes (UGDP) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) aparecen en la Tabla 32-2.[ref\(1099\)](#)

El *sistema de Punteo de Wilkerson* utiliza puntos como los indicados entre paréntesis en la Tabla 32-2. Dos puntos o más es un valor que sugiere diabetes mellitus. Se usa una dosis uniforme de 100 g de glucosa. El *sistema Fajans-Conn* le permite a uno juzgar un individuo como diabético si dos o más criterios (Tabla 32-2) no se exceden. Se emplea una dosis de glucosa basada en 40g de glucosa por metro cuadrado del área de la superficie corporal. El sistema de OMS sugiere mala tolerancia a la glucosa o diabetes cuando los niveles de glucosa ya sea en el ayuno o después de dos horas exceden los 1390 mg/L (Tabla 32-2). Cuando el valor a las dos horas es de 1400 a 2000 mg/L se sugiere diabetes mellitus. El UGDP evalúa la prueba de tolerancia a la glucosa oral sumando los valores de glucosa del plasma en el ayuno, 1, 2 o 3 horas (Tabla 32-2). Una suma que exceda los 5990 mg/L sugiere diabetes mellitus. Se emplea una carga de glucosa de 30g por metro cuadrado del área de la superficie corporal.



El Grupo Nacional de Datos de Diabetes^{ref(1100)} sugiere que se administre la PTGO solamente a los adultos con valores de glucosa plasmática en ayuno menores que 1400 mg/L. Virtualmente todas las personas con un valor de glucosa plasmática en ayuno mayor que 1400 mg/L en más de una ocasión presentarán una PTGO anormal. Para las adultas no-embarazadas, la dosis se aumenta a 100 g. Para los niños la dosis es de 1.75 g/Kg del peso corporal ideal hasta un máximo de 75 g. Las muestras sanguíneas se extraen mientras el paciente está en ayuno y a intervalos de 30 minutos después de la ingestión de la dosis de glucosa durante 2 horas, excepto en embarazadas, de quienes se extrae también una muestra a las 3 horas. El TDG se indica en las adultas no-embarazadas entre 1400 y 200 mg/L y al menos otro valor mayor de 2000 mg/L. La diabetes mellitus se indica en las adultas no embarazadas por un nivel de glucosa plasmática de 2 horas y al menos otro valor mayor de 2000 mg/L. El TDG se indica en los niños por un nivel de glucosa plasmática de 2 horas entre 1400 y 2000 mg/L. La diabetes mellitus se indica en los niños por un nivel de glucosa plasmática en ayuno mayor de 1400 mg/L, un nivel de 2 horas mayor de 2000 mg/L y al menos un valor mayor de 2000 mg/L. La diabetes gestacional se indica cuando dos o más de los criterios siguientes están excedidos: un valor de una hora mayor de 1900 mg/L, un valor de 2 horas mayor de 1650 mg/L y un valor de 3 horas mayor de 1400 mg/L.

La forma de la curva de tolerancia a la glucosa es útil en la evaluación de PTGO (ver Fig. 32-8). Los sujetos saludables presentan un pico a la media hora y retornan a los niveles de ayuno a las 2 horas. El pico de los diabéticos se retarda (aproximadamente 1 hora) o hasta muestra un plateau a las 2 a 3 horas y retorna al valor base después de las 3 horas.

Las determinaciones de insulina realizadas junto con las determinaciones de glucosa son útiles para evaluar la PTGO. Los niveles de insulina plasmáticos después de una carga de glucosa diferencian la diabetes tipo I de la tipo II. En los no-diabéticos los niveles de insulina presentan un pico después de una carga de glucosa y retornan a los niveles de ayuno a las 2 a 3 horas. Los diabéticos tipo I responden a una carga de glucosa con poco o ningún aumento de insulina por encima de los niveles en ayuno. Los diabéticos tipo II responden al cambio con un aumento anormalmente lento y a menudo excesivo en los niveles de insulina. Los diabéticos tipo I a menudo presentan niveles bajos de insulina en el ayuno. Los diabéticos tipo II presentan niveles variables de insulina en el ayuno.

La PTGO ha sido criticado.^{refs(1101)} Debido a que muchas de las variables que afectan los resultados de los tests son difíciles de controlar, la reproducibilidad de la prueba es pobre. Los esquemas diferentes de evaluación para la misma PTGO a menudo producen interpretaciones diferentes. En general, la prueba tiende a sobrediagnosticar mucho la diabetes. Un grupo de investigadores sugiere un esquema de evaluación más conservativa en el cual los niveles de glucosa deben exceder los 2590 mg/L a la hora y los 2190 mg/L a las 2 horas para que la PTGO sea considerada anormal.^{ref(1102)} Otros han sugerido agregar 95 mg/L al valor de glucosa de 1 hora y 53 mg/L al valor para 2 horas para cada década después de 40 años de edad. No obstante, se ha estimado que solamente del 1% al 5% de los individuos con una PTGO anormal se volverán diabéticos cada año.^{ref(1103)} La PTGO es mejor utilizado para avalar individuos que presentan niveles límites de glucosa en ayuno o se encuentran en riesgo de contraer diabetes y también para distinguir la diabetes del tipo I de la diabetes del tipo II.

Prueba de tolerancia a la glucosa por vía intravenosa

La prueba de tolerancia de glucosa por vía intravenosa se utiliza a menudo en personas con

1300



desórdenes de malabsorción o con cirugía gástrica o intestinal previa. La glucosa es administrada intravenosamente por encima de 30 minutos, utilizando una solución al 20%. Se utiliza una carga de glucosa de 0.5 g/Kg del peso corporal. Los no-diabéticos responden con un nivel de glucosa plasmática de 2000 a 2500 mg/L. La interrupción en la administración de glucosa conduce a una disminución de los niveles de glucosa plasmática con niveles de ayuno alcanzados a los 90 minutos. Los diabéticos demuestran niveles de glucosa plasmática por encima de los 2500 mg/L durante la administración de la carga. Al interrumpir la administración, los niveles de glucosa plasmática de los diabéticos también retornan a los niveles en el ayuno a los 90 minutos. Un procedimiento alternativo llamado el método de Soskin utiliza 50% de glucosa administrada intravenosamente entre los 3 y 5 minutos. La carga de glucosa utilizada es de 0.3 g/Kg de peso corporal. Los no-diabéticos restablecen los niveles en ayuno antes de los 60 minutos después de la interrupción de la infusión de glucosa. En los diabéticos los niveles en el ayuno son restablecidos significativamente después de los 60 minutos.

Cambio del Compuesto Analizado en la Enfermedad

A continuación se describe un resumen de los cambios del compuesto analizado en la diabetes mellitus. Para cada compuesto analizado se compara los niveles de la diabetes controlada, de la cetoacidosis diabética y del CNHH.

Glucosa plasmática en el ayuno (ver métodos, p. 634)

La glucosa plasmática en el ayuno y la glucosa urinaria son los marcadores más comúnmente usados para la diabetes mellitus. En general, los niveles repetidos de glucosa plasmática en el ayuno que excedan los 1400 mg/L sugieren evidentemente diabetes, siempre que no se administren drogas como los glucocorticoides y que no se encuentren presentes enfermedades y condiciones como las enumeradas en el cuadro. Los niveles repetidos de la glucosa plasmática desde 1150 a 1400 mg/L pueden indicar la presencia de diabetes.

La glucosa plasmática en el ayuno es directamente proporcional a la gravedad de la diabetes mellitus. Los niveles por encima de 1800 mg/L pueden producir glucosuria. La cetoacidosis puede ocurrir casi a cualquier nivel por encima de los 1400 mg/L pero es más común a niveles por encima de los 1800 mg/L. El CNHH se encuentra asociado con los niveles de glucosa por encima de los 6000 mg/L.

Los diabéticos que se encuentran bajo control exhiben amplias variaciones en sus concentraciones de glucosa plasmática. Los niveles de glucosa plasmática en los diabéticos controlados varían durante un período típico de 24 horas desde valores bajos como 250 mg/L hasta tan altos como 3250 mg/L. Estas variaciones son considerablemente más amplias que las de los no-diabéticos. [ref\(1104\)](#) Amplias oscilaciones en la glucosa plasmática contribuyen al desarrollo de complicaciones diabéticas. Las cantidades excesivas de insulina causan hipoglucemia inducida por insulina, lo que a menudo conduce al coma. Por otro lado, el control inadecuado de los niveles de glucosa causa complicaciones diabéticas como las descritas anteriormente. Generalmente, la glucosa plasmática en ayuno en los diabéticos se mantiene a concentraciones normales o ligeramente por encima de lo normal.

**Condiciones y Enfermedades que a menudo causan
Hiperglucemia y Glucosuria o Glucosuria en ausencia
de Hiperglucemia**

Hiperglucemia y glucosuria

Septicemia	Hipercortisolismo
Cáncer pancreático	Glucagonoma
Pancreatitis aguda	Somatostatinoma
Feocromocitoma	Aldosteronismo primario
Hipertiroidismo	Infarto agudo de miocardio
Acromegalia	Hemorragia cerebral

Glucosuria y glucosa plasmática normal

Embarazo (la absorción renal está reducida)
Raquitismo resistente a la vitamina D
Osteomalacia (malfunción tubular proximal)
Degeneración hepatolenticular

Glucosa urinaria

La glucosa urinaria es un marcador pobre para la diabetes mellitus. El límite normal para la glucosa renal es de 1800 mg/L. Los niveles de glucosa sanguínea deben exceder este valor antes de que excesiva glucosa sea aparente en la orina. Aun más complicado es el hecho de que el límite renal en los diabéticos a menudo aumenta por encima de los 3000 mg/L. Algunas enfermedades y condiciones que producen tanto hiperglucemia como glucosuria no están nombradas en el cuadro precedente. Este cuadro también nombra las condiciones que causan glucosuria en ausencia de hiperglucemia.

Monitoreo personal y hospitalario de la glucosa sanguínea

El logro de la terapia para los diabéticos es mantener niveles normales de glucosa de manera de minimizar las complicaciones agudas y a largo plazo de la enfermedad. La terapia agresiva para lograr este cometido tiene el principal efecto colateral de un riesgo creciente a hipoglucemia (ver arriba). Sin embargo, un monitoreo constante de los niveles de glucosa sanguínea ha sido ayudado por el desarrollo de monitoreo de glucosa cada vez más exacto y confiable (ver capítulo 17). En un informe de consenso acerca del monitoreo de glucosa sanguínea, muchas de las poblaciones tratadas con insulina han sido recomendadas para estos programas de auto-monitoreo. [ref\(1105\)](#) Dichas poblaciones incluyen mujeres embarazadas, pacientes con diabetes inestable, pacientes con historias de cetosis severa o hipoglucemia, especialmente aquellos en los que no se advierten síntomas de hipoglucemia, pacientes que reciben terapia intensiva con insulina, y pacientes con límites renales anormales para la glucosa.

El panel de consenso también tuvo importantes recomendaciones para idear el monitoreo de la glucosa sanguínea, las que son ampliamente empleadas en los hospitales para monitoreo en la internación y control de los niveles de glucosa sanguínea. El uso correcto de tales disposiciones (ver métodos p.319) minimizaría las amplias variaciones de la glucosa sanguínea experimentadas por los diabéticos y, como resultado, también la hipoglucemia y



aun las complicaciones de la diabetes, a largo plazo.

Hemoglobina glucosilada y albúmina plasmática

Un derivado menor de la hemoglobina llamado HbA_{1c} es producido por glucosilación. Debido a que esta reacción no es enzimática y debido a que el glóbulo rojo es completamente permeable a la glucosa, la cantidad de HbA_{1c} formada es directamente proporcional a la concentración promedio de glucosa plasmática del glóbulo rojo expuesto durante un período de vida de 120 días, es decir, de 4 a 6 semanas antes del muestreo. De esta manera, en la hiperglucemia a largo plazo, la HbA_{1c} constituye un porcentaje de la hemoglobina total mayor que en la normoglucemia. Las elevaciones transitorias de la glucosa plasmática solamente afectan moderadamente los niveles de HbA_{1c} .

La HbA_1 consiste realmente de cuatro componentes principales, llamados HbA_{1a} , HbA_{1b} , y HbA_{1c} .^{ref(1106)} Como se puede ver en la Tabla 32-3 cada una consiste de dos componentes, un componente lábil, que es la aldimina, y un componente estable, la cetamina. Para las personas normoglicémicas, HbA_{1a1} , HbA_{1a2} y HbA_{1b} constituyen del 0.4% al 0.8% de la hemoglobina total. La HbA_{1c} constituye del 4% al 5% de la hemoglobina total. La HbA_1 total es normalmente del 5.0% al 7.0% (ver los métodos, p.635, Tabla 32-8). Como se aprecia en la Tabla 32-3 los diabéticos presentan porcentajes totales de HbA_1 y HbA_{1c} significativamente elevados. Las elevaciones son directamente proporcionales al grado de hiperglucemia a largo plazo.^{ref(1107)} Las hemoglobinas glucosiladas son más útiles en el monitoreo de la diabetes; ellas no son lo suficientemente sensibles como para detectar en forma efectiva los casos límite de la diabetes mellitus.^{ref(1108)}

Como se aclaró arriba, la albúmina sérica se encuentra también glucosilada en un grado proporcional a los niveles de glucosa sanguínea. La vida media relativamente corta de 15 días para la albúmina hace que sea un buen monitor a corto plazo de los niveles de glucosa sanguínea.^{ref(1109)}

Insulina

Los niveles de insulina plasmática en el ayuno en los diabéticos de tipo I son generalmente bajos. Los correspondientes a los diabéticos de tipo II son bajos solamente cuando los niveles de glucosa sanguínea en el ayuno exceden los 2500 mg/L. De lo contrario, son normales.^{ref(1110)} Una contradicción en la glucosa separa a los diabéticos del tipo I de los del tipo II. Una administración de glucosa produce respuesta a la insulina no significativa para los diabéticos de tipo I y una respuesta a menudo exageradamente demorada para los diabéticos del tipo II.

Cetoácidos

Las elevaciones significativas de acetoacetato y de beta-hidroxibutirato causan cetoacidosis diabética. Es importante medir tanto los niveles de cetoácidos sanguíneos como los urinarios, ya que los niveles de cetoácidos plasmáticos pueden ser normales aun cuando las concentraciones de cetoácidos urinarios sean altas. Este efecto es causado por la excreción aumentada de cetoácidos urinarios lo que resulta de la compensación renal a pH bajo. Tanto la cetonemia como la cetonuria están ausentes en el CNHH. Los diabéticos controlados deben

tener niveles normales de cetoácidos tanto sanguíneo como urinario.

La prueba del nitroprusiato (comúnmente conocido como Acetest) es útil para la detección del ácido acetoacético (AcAc) en la sangre y en la orina (ver p.632). El nitroprusiato no reacciona con el beta-hidroxibutirato (β -HBA) y reacciona solamente débilmente con acetona (20%). En los primeros estadios de cetoacidosis diabética, los niveles de acetoacetato son a menudo normales (AcAc: β -HBA, 1:3) o solamente moderadamente elevados. En los últimos estadios de la cetoacidosis los niveles de beta-hidroxibutirato son marcadamente elevados (AcAc: β -HBA, 1:30). Bajo estas condiciones la prueba del nitroprusiato puede producir significativamente una baja estimación de la gravedad de la cetoacidosis. A medida que la cetoacidosis se torna controlada, el beta-hidroxibutirato es metabolizado a ácido acetoacético, y la prueba del nitroprusiato puede tornarse fuertemente positivo.

Proteína urinaria

Uno de los primeros signos de nefropatía glomerular inminente es la excreción aumentada de albúmina en la orina, también denominada *microalbuminuria*. Se ha sugerido que los diabéticos fueran monitoreados para microalbuminuria (ver p. 492) y de esta manera esta complicación de la diabetes puede ser tratada y prevenida con tiempo.

Acido láctico (ver p. 481)

Los niveles de ácido láctico en el plasma son frecuentemente elevados (la acidosis láctica) durante la cetoacidosis diabética.

El ion hidrógeno (pH)

Las altas concentraciones de ion hidrógeno en el plasma (bajo pH) tienen lugar en la cetoacidosis diabética, cetoacidosis con acidosis láctica y en el CNHH. Los niveles de pH por debajo de 7.0 están asociados con un pronóstico pobre.

Electrolitos

Los diabéticos no controlados pueden exhibir niveles de sodio plasmático, normales, bajos o altos. Los niveles de sodio plasmático en los diabéticos están influenciados por tres factores, descritos en el texto.

La hiperglucemia causa un aumento en la presión osmótica del plasma. Como resultado el agua fluye de las células al plasma. Los constituyentes plasmáticos están entonces diluidos. De esta manera, la hiponatremia (bajo sodio en el plasma) es común en la diabetes. En la cetoacidosis diabética cantidades excesivas de sodio son excretadas en la orina, disminuyendo posteriormente los niveles plasmáticos de sodio. Sin embargo, el hecho complicado es la excreción preferencial de agua en relación al sodio. Este efecto compensa la pérdida de sodio de los niveles altos de glucosa plasmática y cetosis, resultando de esta manera en niveles plasmáticos normales o hasta elevados.

Los mismos factores descritos arriba afectan los niveles de potasio en el plasma. Sin embargo, para el potasio, están operando dos factores adicionales. Primero, la insulina causa el transporte de potasio intracelular hacia el plasma. La hipocalemia (bajo potasio plasmático) tiene lugar cuando hay insuficiencia de insulina (diabéticos tipo I). Segundo, en acidosis, el potasio se mueve hacia afuera de las células. De esta forma, en la cetoacidosis diabética,



cantidades significativas del ion potasio son movilizadas desde la células al plasma. Esto produce hipercalemia (alto potasio plasmático). Los diabéticos tipo II normalmente exhiben hipocalemia o normocalemia. Sin embargo, debido a las pérdidas urinarias de potasio, los diabéticos en CAD siempre requieren una terapia de reemplazo y monitoreo durante la terapia.

Los niveles de bicarbonato plasmáticos son normales en los diabéticos controlados. La cetoacidosis causa niveles bajos de bicarbonato en el plasma. El cuerpo responde a la cetoacidosis por retención en el riñón de bicarbonato y una respiración rápida y profunda denominada *respiración Kussmaul* la cual remueve el CO_2 . Ambos mecanismos de compensación elevan el pH. La respiración Kussmaul disminuye del Pco_2 . Tanto el bicarbonato plasmático como el Pco_2 son bajos en la cetoacidosis diabética.

Osmolalidad

La osmolalidad del suero se encuentra aumentada tanto en la cetoacidosis como en el CNHH debido a la pérdida de agua que acompaña a la excreción de glucosa. La osmolalidad del suero en el CNHH está generalmente por encima de los 350 mOsm/Kg, un valor adecuado de la condición ("hall mark").

Volumen del líquido corporal

La pérdida renal de agua en la cetoacidosis diabética produce disminución severa de volumen, a menudo hasta de 6 a 8L. Los pacientes con CNHH pueden tener déficits de fluidos mayores que 9 L. Un Volumen bajo de líquido (hipovolemia) a menudo coexiste con la hiponatremia. La terapia con insulina reestablece los valores normales tanto del Volumen de fluido como del sodio plasmático.

Hiato aniónico

En la cetoacidosis el hiato aniónico se encuentra siempre aumentado debido a la formación excesiva de cetoácidos. La acidosis láctica aumenta aun más el hiato debido a los niveles altos de lactato.

Nitrógeno de la urea sanguínea (BUN)

Los niveles de BUN están aumentados tanto en la cetoacidosis diabética como en el CNHH debido al catabolismo elevado de proteínas y a la azotemia prerrenal, secundaria a la pérdida de fluidos extracelulares. La azotemia prerrenal se refiere al BUN aumentado causado por un flujo renal disminuido. En la cetoacidosis diabética, la azotemia prerrenal es causada por hipovolemia.

Lípidos

Los triglicéridos plasmáticos elevados, colesterol y VLDL se encuentran comúnmente en los diabéticos. Por otro lado, el HDL es generalmente bajo.

Método de Análisis

Cetonas, ácido acetoacético y ácido beta-hidroxibutírico totales

Steven C. Kazmierczak



Principios de análisis y uso corriente.

El acetoacetato, la acetona y el ácido beta-hidroxibutírico son metabolitos del catabolismo graso producidos en cantidades excesivas en individuos con diabetes insulino-dependiente (tipo I) y en individuos que metabolizan los almacenamientos de lípidos.^{ref(1111)} Los cuerpos cetónicos del suero incluyen piruvato, acetoacetato y acetona y las formas reducidas, ácido láctico y ácido. La gravedad y tipo de enfermedad pueden causar variaciones severas en la proporción de cetonas que están presentes. Este hallazgo y el hecho de que ningún procedimiento enzimático o químico corrientes puede medir todos los cuerpos cetónicos simultáneamente limita la utilidad diagnóstica de las cetonas.

La medida del ácido acético es importante para la evaluación de la cetosis. Las determinaciones de este compuesto son llevadas a cabo más frecuentemente para el diagnóstico y manejo de los pacientes con diabetes. Las concentraciones de acetoacetato se encuentran aumentadas en la diabetes, en la hambruna y en cualquier situación estrés que resulte en la producción de un estado hiperglicémico.

Cetonas totales

Steven C. Kazmierczak

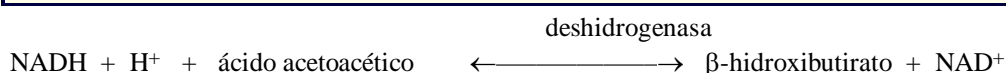
Principios de análisis y uso corriente.

Varios métodos cuantitativos para las cetonas, que son solamente de interés histórico, pueden encontrarse en la segunda edición de este libro. Un inconveniente de estos procedimientos es que ellos miden solamente acetona, la cual representa una proporción muy pequeña de los cuerpos cetónicos totales presentes normalmente.

La reacción colorimétrica que ocurre entre las cetonas y el nitroprusiato (nitroferricianuro de sodio) es el método más ampliamente utilizado para la medida semicuantitativa rápida de las cetonas empleadas actualmente (Tabla 32-4, método 1).^{refs(1112)} Para la determinación semicuantitativa del ácido acetoacético y de la acetona en el suero o en la orina, el cambio de color producido con los reactivos embebidos en la varilla de inmersión se compara con un diagrama de color. Aun cuando tanto la acetona como el ácido acético producen un cambio de color en esta reacción, el método es más sensible al ácido acetoacético (50 a 100 mg/L) que a la acetona (200 a 150 mg/L). Este ensayo se encuentra disponible comercialmente en la forma de una tira reactiva o *dipstick*, generalmente papel impregnada con nitroprusiato, glicina y fosfato de sodio (Ames Inc., División de los Laboratorios Miles, Elkhart, Indiana). Si es usado para las cetonas en la orina, las muestras de orina con una densidad de 1.010 a 1.020 producen los resultados más exactos. La orina altamente coloreada o el suero hemolizado pueden provocar con este método, resultados falso-positivos. El reactivo químico seco debe protegerse del aire para evitar el deterioro. Los métodos para estabilizar el complejo de nitroprusiato coloreado incluyen el agregado de varios amortiguadores, sales metálicas y estabilizadores orgánicos.

Se han desarrollado también los procedimientos enzimáticos que pueden medir tanto el ácido acetoacético como el beta-hidroxibutírico. (Tabla 32-4, método 2).^{ref(1113)} La reacción general que se usa para la determinación enzimática de las cetonas es la siguiente:

β -hidroxibutirato



Cuando la reacción anterior se lleva a cabo a pH entre 8.5 y 9.5, la reacción procede hacia la derecha. La concentración de ácido β -hidroxibutírico puede ser cuantificada por medida del aumento en absorbancia a 340 nm causada por la producción del NADH. Si el ensayo se desarrolla a pH 7.0, la reacción procede hacia la derecha y la cantidad de ácido acetoacético que se encuentra presente puede determinarse por el aumento de absorbancia a 340 nm causado por la desaparición del NADH. Una ventaja de los métodos enzimáticos con respecto a los procedimientos colorimétricos es que son más específicos para cetonas.

Tanto la cromatografía gaseosa (CG; Tabla 32-4, método 3)[ref\(1114\)](#) y el HPLC[ref\(1115\)](#) han sido desarrollados para cuantificación de acetona y ácido acetoacético. La acetona puede ser cuantificada con el uso de un detector de ionización de llama. El ácido acetoacético se estima por medida de la acetona antes y después del calentamiento de la muestra; el calentamiento convierte al ácido acetoacético en acetona. Aunque el CG y el HPLC no son adecuados para análisis rápidos o "stats" o aun para las determinaciones rutinarias de cetona en la mayoría de los laboratorios, la determinación de acetona puede ser benéfica para identificar los pacientes con ingestión de isopropanol.[ref\(1116\)](#)

Muestra.

La orina que ha sido centrifugada para remover las partículas, el suero o el plasma puede ser usada para la prueba colorimétrica semicuantitativa del nitroprusiato. El suero o el plasma pueden ser utilizados para los ensayos enzimáticos de las cetonas.

La pérdida de cetonas atribuible a la acción microbiana puede causar resultados falso negativos de la prueba. Debido a que la acetona es una sustancia volátil, tanto las muestras de sangre y de orina pueden ser mantenidas en un container cerrado para evitar la pérdida por evaporación. La refrigeración de los ejemplares puede estabilizar la muestra.

Intervalos de referencia.

Los rangos de referencia que han sido establecidos para el acetoacetato del suero son de 5 a 30 mg/L (0.09 a 0.52 mmol/L).[ref\(1117\)](#) No han sido reportadas diferencias en los cuerpos cetónicos relacionadas con la edad.[ref\(1118\)](#) Para las otras cetonas, los rangos de referencia son menores de 10 mg/L (0.1 mmol/L), mientras que se han informado rangos de referencia para el beta-hidroxibutirato menores de 0.7 $\mu\text{mol/L}$.[ref\(1119\)](#)

Acido acetoacético

Steven C. Kazmierczak

Principios de análisis y uso corriente.

El ácido acetoacético puede medirse usando una variedad de técnicas; sin embargo, los métodos más comunes actualmente en uso son los ensayos colorimétricos y los procedimientos enzimáticos.

El procedimiento más común desarrollado para el ácido acético es el procedimiento colorimétrico, descrito arriba, basado en la reacción del acetoacetado con el nitroprusiato de sodio (Tabla 32-4, método 1).[ref\(1120\)](#) Además de la tecnología de tira seca de nitroprusiato



(dipstick), se encuentra disponible también una formulación en tableta (Ames Co., División de los Laboratorios Miles, Elkhart, Indiana). El suero o la orina se coloca directamente sobre la tableta, y se registra cualquier color observado. Este procedimiento es más sensible que el procedimiento *dipstick*. Aun cuando los procedimientos *dipstick* y los de tableta para la determinación del ácido acetoacético son cuando mucho semicuantitativos, presentan la ventaja de ser rápidos y convenientes para ser llevados a cabo y se encuentran rápidamente disponibles durante 24 horas al día. La reacción del nitroprusiato no es específica para el acetoacetato (ver arriba).

Además, los compuestos que contengan grupos sulfhidrilos libres, tales como el captopril, la *N*-acetilcisteína y la penicilamina, también reaccionan con el nitroprusiato para producir un color rojo púrpura.^{ref(1121)} Una variedad de técnicas pueden usarse para reconocer las reacciones falso-positivas para las cetonas causadas por los compuestos libres de sulfhidrilo. Estas incluyen el agregado de ácido acético glacial a la reacción amortiguadora y la observación de que las reacciones para cetonas falso-positivas, causadas por los compuestos libres de sulfhidrilo, resultan en un desarrollo instantáneo del color después del agregado de la muestra al reactivo amortiguador, mientras que el ácido acetoacético resulta en el desarrollo del color el cual aumenta la intensidad durante al menos 60 segundos.^{ref(1122)} De esta manera, el tiempo exacto es extremadamente importante para una correcta interpretación de la reacción con el nitroprusiato. El color púrpura producido en la reacción con el nitroprusiato puede también ser medido espectrofotométricamente a 550 nm para la determinación cuantitativa de las concentraciones de acetoacetato.^{ref(1123)}

Aun cuando generalmente no son requeridas clínicamente medidas cuantitativas precisas de acetoacetato, se han desarrollado procedimientos que permiten llevar a cabo las determinaciones cauntitativas del acetoacetato. El método más común en uso para la cuantificación de las concentraciones de acetoacetato es el procedimiento enzimático que utiliza beta-hidroxibutirato deshidrogenasa (Tabla 32-4, método 2).^{ref(1124)} Este ensayo se basa en la reducción del acetoacetato a beta-hidroxibutirato por la enzima beta-hidroxibutirato deshidrogenasa con oxidación concomitante de NADH a NAD⁺. La disminución del NADH se mide espectrofotométricamente a 340 nm y está relacionada con las concentraciones de acetoacetato presentes en la muestra. Se han desarrollado ambos métodos de análisis,^{ref(1125)} de punto terminal y cinéticos.^{ref(1126)}

Especimen

El suero, el plasma y la orina son especímenes aceptables. Las concentraciones de acetoacetato en el suero o en el plasma deberían medirse dentro de la hora después de la flebotomía, o de lo contrario, las muestras deberían mantenerse en hielo si el análisis se demora.^{ref(1127)} Las muestras son estables hasta 6 horas cuando son mantenidas en un baño de hielo.

Intervalo de referencia.

Las concentraciones de ácido acetoacético en el suero de individuos sanos son menores de 0.1 mmol/L cuando son medidas utilizando el procedimiento enzimático.

Acido beta-hidroxibutírico

Steven C. Kazmierczak



Principios de análisis y uso corriente.

La medida del beta-hidroxibutirato no es frecuente ser llevada a cabo en los laboratorios clínicos; la medida de acetoacetato y acetona es el medio más común para determinar rápidamente la cetoacidosis. Sin embargo, la medida del beta-hidroxibutirato puede ser útil para propósitos de monitoreo en pacientes con cetoacidosis. En los pacientes con acidosis severa, la producción aumentada de NADH favorece la formación de beta-hidroxibutirato a partir del acetoacetato, elevando la proporción de beta-hidroxibutirato a acetoacetato (β -HB/AcAc). Como el paciente es tratado por cetoacidosis como causa fundamental, la relación (β -HB/AcAc) disminuirá a medida que el beta-hidroxibutirato es oxidado a acetato. Esta oxidación del beta-hidroxibutirato a acetoacetato puede resultar en un aumento en el acetoacetato, aun cuando mejore la condición del paciente.

Los métodos desarrollados para medir el β -hidroxibutirato incluyen los métodos clorimétricos basados en la oxidación del β -hidroxibutirato a acetona por medio de un ácido, con la medida siguiente de acetona formada. [ref\(1128\)](#) La medida de CG de beta-hidroxibutirato se basa en la medida inicial de acetona endógena en una alícuota seguida por una segunda medida desarrollada en otra alícuota después de la oxidación del beta-hidroxibutirato a acetona. La concentración de beta-hidroxibutirato en el ejemplar se obtiene por sustracción de acetona endógena medida en el paso 1 a partir la medida en paso 2. El procedimiento colorimétrico es de interés histórico; lo que limita su uso es la pobre recuperación, la no especificidad y la larga duración del procedimiento. [ref\(1129\)](#) El procedimiento del CG es más exacto; sin embargo, la utilización de instrumentación especializada también limita su uso.

Se ha desarrollado un método enzimático para la determinación del beta-hidroxibutirato rápido, preciso y fácilmente automatizado (Tabla 32-4, método 2). En este procedimiento, descrito arriba, la hidrazina es agregada para remover el acetoacetato que se produce, el cual permite la oxidación de todo el beta-hidroxibutirato disponible. El procedimiento enzimático ha sido automatizado.

Una técnica isotacoforética nuevamente desarrollada utiliza un campo eléctrico para separar el beta-hidroxibutírico de otros compuestos aniónicos dentro de un tubo capilar (Tabla 32-4, método 4). [ref\(1130\)](#) Este método es sensible y rápido de desarrollar; sin embargo, se requiere un equipo especializado, y si no se fijan estrictamente las condiciones de pH óptimo los resultados obtenidos pueden ser pobres.

Especimen

Tanto el suero como el plasma son ejemplares aceptables. Los anticoagulantes que incluyan el oxalato, el fluoruro, EDTA, citrato y la heparina no interfieren con estos ensayos. Los ejemplares recogidos podrían separarse de los glóbulos rojos dentro de las 24 horas. El suero o el plasma separados son estables hasta una semana si se mantienen a 4°C. [ref\(1131\)](#)

Intervalo de referencia.

El intervalo de referencia normal del β -hidroxibutirato en el suero de adultos saludables parece ser dependiente del método usado para su análisis. El rango de valores encontrados en los adultos saludables utilizando un procedimiento enzimático para las determinaciones del β -hidroxibutirato eran de 0.02 a 0.27 $\mu\text{mol/L}$. [ref\(1132\)](#)



Glucosa

Steven C. Kazmierczak

Principios de análisis.

Para la medida de la glucosa se ha desarrollado una amplia variedad de métodos. Los primeros métodos utilizaban algunas propiedades no específicas de la glucosa como un medio para sus determinaciones. Estos incluyen la capacidad del grupo aldehído de la glucosa para reducir las sales de cobre o ferricianuro con una amina aromática, tal como la *o*-toluidina, para formar una glucosamina coloreada.

El método de reducción con cobre se basa en la habilidad de la glucosa para reducir los iones cúpricos (Cu^{++}) a iones cuprosos (Cu^{+}). En presencia de calor los iones cuprosos reducidos forman óxido cuproso (Cu_2O), el cual puede ser detectado por una variedad de técnicas. Los métodos más populares de reducción del cobre vinculan la reacción del óxido de cobre con el fosfomolibdato (Flin-WU) or el arsenomolibdato (Symogyi-Nelson) para formar compuestos de molibdeno coloreados. Las interferencias químicas por otros azúcares y compuestos metabólicos hacen que estos procesos no sean específicos para la glucosa. Como resultado dichos métodos ya no se utilizan más.

Una modificación del método de reducción del cobre por Benedict^{ref(1133)} (Tabla 32-5, método 1) es ampliamente usado en forma corriente como un método semicuantitativo para medir glucosa en orina. El procedimiento es sensible a todos los compuestos reductores presentes en la orina y por lo tanto no es específico para la glucosa solamente. Después de la reacción de los iones cúpricos con la glucosa en presencia de calor, este procedimiento produce Cu_2O rojo y CuOH amarillo. Cuanto mayor es la concentración de glucosa, más intenso es el color producido. Aun cuando este método no es específico para la glucosa, puede ser usado con un ensayo específico para la glucosa para rastrear enfermedades genéticas del metabolismo de los carbohidratos en los recién nacidos y en los niños pequeños (ver p. 960). Una reacción positiva de Benedict en conjunto con una prueba negativa para la glucosa utilizando un ensayo específico para glucosa es indicador de tales enfermedades (ver Capítulo 47 para más discusión sobre los desórdenes hereditarios del metabolismo de los carbohidratos).

Los métodos del ferricianuro se basan en la habilidad de la glucosa para reducir al ferricianuro en solución alcalina a ferrocianato y está sujeto a interferencia positiva significativa a partir de compuestos tales como la creatinina y el ácido úrico. El procedimiento de la *o*-toluidina para medir la glucosa ha sido reemplazado por otros métodos debido a la confusión que se obtiene sobre la salud cuando se utiliza *o*-toluidina, ya que éste actualmente se clasifica como un carcinógeno. Este procedimiento también presenta problemas de interferencia con urea y otras hexosa azúcares, como la manosa y galactosa. Tanto el método del ferricianuro como el de la *o*-toluidina no son más de uso corriente.

El procedimiento más común de uso corriente para la medida de glucosa utiliza enzimas como la glucosa oxidasa o hexocinasa, lo que permite una medida de las concentraciones de glucosa altamente sensitiva, exacta y precisa. Estas enzimas han sido usadas en el desarrollo de una amplia variedad de aplicaciones.

GLUCOSA OXIDASA. La enzima glucosa oxidasa ha sido utilizada tanto en ensayos polarográficos como colorimétricos. La mayoría de las preparaciones de reactivos incluyen



también que la enzima mutarrotasa para convertir la alfa-D-glucosa en beta-D-glucosa. Esto es necesario porque la glucosa oxidasa es específica para la beta-D-glucosa solamente.

La determinación *polarográfica* de la glucosa con un electrodo de O_2 y glucosa oxidasa permiten un medio rápido de medición de glucosa (Tabla 32-5, método 2). En este procedimiento la glucosa reacciona con O_2 en una reacción catalizada por la glucosa oxidasa, produciendo ácido glucónico y peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno es eliminado por esta reacción con catalasa en una reacción colateral. La cantidad de O_2 consumido es medido por un electrodo de oxígeno y directamente relacionado a la concentración de glucosa en la muestra.

La reacción de la glucosa oxidasa ha estado también acoplada con una segunda reacción catalizada por enzima (Tabla 32-5, método 3). La reacción inicial catalizada por la glucosa oxidasa produce ácido glucónico y peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno producido en el paso inicial puede reaccionar con una variedad de colorantes en una reacción catalizada por la peroxidasa del rabo del caballo, para producir un colorante oxidado que es coloreado. El procedimiento de acoplamiento de la glucosa oxidasa está sujeto a interferencia por muchos compuestos en el suero y en la orina, incluyendo la bilirrubina, el ácido ascórbico y el ácido úrico. Estas sustancias pueden ser oxidadas por el peróxido de hidrógeno producido en el paso catalizado por la glucosa oxidasa dando lugar a una influencia negativa.

La interferencia negativa por la bilirrubina puede ser un problema severo en un cuidado intensivo, en donde un gran porcentaje de muestras puede ser icterico.

Las medidas de glucosa en el líquido cefalorraquídeo (LCR) pueden tener interferencia significativa del ascorbato con este método debido a que el LCR normalmente contiene mayores concentraciones de ascorbato y bajas concentraciones de glucosa que lo que presenta el suero.^{ref(1134)} Se recomienda el uso de un método alternativo para los ejemplares de LCR.^{ref(1135)}

La reacción de la glucosa oxidasa ha sido automatizada en una variedad de instrumentos y ha sido también adaptada para el uso en un *dipstick* de orina. Cuando es usado en un formato *dipstick*, este procedimiento es altamente específico para la glucosa. Sin embargo, las sustancias oxidativas fuertes, tales como el hipoclorito y el cloruro, pueden producir una reacción positiva mientras que compuestos, tales como el ácido ascórbico que interfieren con el paso de la peroxidasa pueden dar valores de glucosa falsamente bajos.

HEXOCINASA. Otro procedimiento enzimático frecuentemente usado para las determinaciones de glucosa es la reacción acoplada de hexocinasa-glucosa-6- fosfato deshidrogenasa (Tabla 32-5, método 4). En este método, la hexocinasa fosforila a la glucosa en presencia de ATP para producir glucosa-6-fosfato. La glucosa-6-fosfato reduce al NAD^+ o al $NADP^+$ en una reacción catalizada por la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa para producir NADH o NADPH respectivamente. El aumento de absorbancia medido a 340 nm está directamente relacionado con las concentraciones de glucosa dentro de una muestra. Esta reacción enzimática acoplada es virtualmente específica para la glucosa y no está sujeta a interferencia del ácido úrico o ascorbato.^{ref(1136)} La comparación del procedimiento enzimático con la hexocinasa versus el método enzimático de la glucosa oxidasa, ha demostrado que el primero es el mejor método, especialmente útil en facilitar el cuidado intensivo.^{ref(1137)}

Otro procedimiento enzimático para la glucosa utiliza la enzima *glucosa deshidrogenasa*, obtenida de *Bacillus megaterium* o *B. Cereus*.^{ref(1138)} El ensayo requiere



solamente un paso simple de reacción, ya que la enzima es NAD^+ dependiente (Tabla 32-5, método 5). La glucosa deshidrogenasa cataliza la reducción del NAD^+ , produciendo gluconolactona y NADH, el cual puede ser monitoreado a 340 nm. Los únicos compuestos que interfieren que se han reportados, la D-xilosa y la manosa, son raramente encontrados en cualquier grado significativo.[ref\(1139\)](#) El método de la glucosa deshidrogenasa ha demostrado ser de mejor sensibilidad y precisión cuando es comparado con los procedimientos de la glucosa oxidasa y de la hexocinasa.[ref\(1140\)](#)

Especimen

El suero o plasma, el líquido cefalorraquídeo y la orina son todos ejemplares aceptables. La glucosa total sanguínea almacenada a temperatura ambiente es metabolizada a una velocidad de aproximadamente 5% por hora. De esta forma las muestras deben ser centrifugadas tan rápido como sea posible para remover el ejemplar de las células. Una vez separada, la glucosa es estable en el suero o en el plasma hasta 3 días cuando se refrigera entre 2° y 8° C. Los ejemplares que no pueden ser separados rápidamente deben ser recogidos en tubos que contengan fluoruro o yodoacetato. Estos compuestos inhiben la glucólisis y de esta manera mantienen la glucosa sanguínea total.

Intervalos de referencia.

Las concentraciones de glucosa en los niños menores de 5 años de edad son aproximadamente del 10 al 15% más bajas que los niveles encontrados en los adultos. Los recién nacidos muestran concentraciones de glucosa desde 200 a 800 mg/L (1.11 a 4.44 mmol/L), aun cuando las concentraciones de glucosa sanguínea en los infantes prematuros son menores.[ref\(1141\)](#) Las concentraciones de glucosa en los adultos saludables varían entre 700 a 1050 mg/L (3.9 a 5.8 mmol/L). Las concentraciones de glucosa del líquido cefalorraquídeo son aproximadamente del 40% al 80% de aquellos valores encontrados en el suero o en el plasma. Las concentraciones de glucosa en el suero son aproximadamente 15% más altas que las concentraciones de glucosa en la sangre total. Debe tomarse en cuenta que las concentraciones totales en la sangre varían con el hematocrito. La glucosa sanguínea total se aproxima muy marcadamente a la glucosa plasmática cuando el hematocrito es bajo. La diferencia del 15% entre la glucosa sanguínea total y la glucosa plasmática descrita arriba es para un valor del hematocrito de aproximadamente el 45%.

La orina normalmente no contiene ninguna glucosa detectable. Sin embargo, los recién nacidos y aquellos individuos con errores congénitos del metabolismo de los carbohidratos pueden excretar suficiente galactosa para dar un resultado positivo de glucosa cuando la glucosa es medida utilizando los métodos no específicos de reducción del cobre.[ref\(1142\)](#)

Hemoglobina Glicada

Andrea Rose

Principios de análisis y uso corriente.

Aun cuando los términos “glicado” y “glucosilado” son usados indiferentemente, glicado es el término preferido para describir el producto de reacción entre un azúcar y una proteína.[ref\(1143\)](#) En todos los individuos, la glicación de hemoglobina adulta normal (A_0) tiene



lugar bajo condiciones fisiológicas que resultan de la formación no enzimática de varios componentes menores de la hemoglobina. Inicialmente, el grupo carbonilo en los azúcares sufren una reacción rápida, reversible con un grupo amino en las aminas para formar una base de Schiff. Esto es seguido por un rearrreglo de Amadori para formar un producto estable.[ref\(1144\)](#) (Fig. 32-10).

El establecimiento del control glicémico puede ser llevado a cabo midiendo la hemoglobina combinada A_1 , la cual está compuesta de hemoglobina A_{1a} (productos de la fructosa-1,6-difosfato y glucosa-6-fosfato con el grupo N-terminal de las cadenas beta), A_{1b} y A_{1c} o cuantificación de A_{1c} , la cual es el componente más abundante de la hemoglobina A_1 . La hemoglobina A_{1c} es el producto de reacción de la glucosa y el grupo N-terminal de las cadenas beta. Las designaciones establecidas para las hemoglobinas A_{1a} , A_{1b} y A_{1c} se derivan del orden en el cual estos componentes menores de la hemoglobina se eluyen después de una cromatografía de intercambio catiónico a partir de un hemolisado de sangre total.

Además de la medida de la hemoglobina A_1 combinada o A_{1c} , se puede usar la medida de la hemoglobina total glicada para evaluar el control glicémico. La hemoglobina glicada total incluye la hemoglobina A_1 y las hemoglobinas con glucosa ligada al grupo amino N-terminal de una cadena α así como el grupo ϵ amino de varios residuos de lisina en ambas cadenas α y β .[ref\(1145\)](#) A diferencia de los componentes de hemoglobina A_1 , la glicación de estos sitios no puede ser determinada por medios cromatográficos o electroforéticos ordinarios. Sin embargo, estas hemoglobinas glicadas pueden ser aisladas rápidamente por el uso de cromatografía por afinidad con boronato.

Los métodos utilizados para la cuantificación de las fracciones de hemoglobina A_1 combinada incluyen la cromatografía de intercambio catiónico (Tabla 32-6, método 1)[ref\(1146\)](#) y electroforesis (Tabla 32-6, método 2).[ref\(1147\)](#)

La cromatografía de intercambio catiónico para la separación de la hemoglobina combinada A_1 se basa en el hallazgo de que las especies de hemoglobinas glicadas A_1 están menos positivamente cargadas a pH neutro que la hemoglobina A_0 . Como resultado de esta diferencia de carga, la hemoglobina glicada A_1 se ligará más lentamente a la resina cargada negativamente contenida dentro de la columna de cromatografía. Cuando un hemolisado se aplica a una columna cargada con la resina, las fracciones A_{1a} , A_{1b} y A_{1c} menos positivamente cargadas eluirán juntas de la columna antes que la fracción de hemoglobina A_0 . La cantidad de hemoglobina de cada fracción se determina espectrofotométricamente a 415 nm. Este método, como la mayoría, reporta el resultado como el porcentaje de hemoglobina glicada ($\%HbA_1$; $HbA_1/[HbA_1 + Hb_0 \times 100]$).

Aun cuando los métodos cromatográficos son engorrosos y llevan mucho tiempo, la disponibilidad de columnas baratas simplifica el desarrollo de este método. La reproducibilidad de esta técnica está afectada por la habilidad para mantener una temperatura uniforme ("1 Grado Celsius) durante el análisis.[ref\(1148\)](#) Otros factores que pueden afectar los resultados de la prueba incluyen pH y fuerza iónica de los amortiguadores que son usados y el tamaño de la columna.[ref\(1149\)](#) La presencia de las variantes de hemoglobina normal tales como las hemoglobinas S, C, D y G, así como las concentraciones aumentadas de hemoglobina F (> 0.5%), pueden también interferir con el análisis. Además, pueden obtenerse concentraciones de hemoglobina A_1 falsamente aumentadas en pacientes con uremia[ref\(1150\)](#) y en pacientes con



alcoholismo. [ref\(1151\)](#)

La separación electroforética de hemoglobina combinada A_1 , se basa en la habilidad del amino N-terminal de la hemoglobina no glicada para interactuar con los grupos negativamente cargados presentes en el medio de soporte. Una vez separadas por electroforesis, las bandas de hemoglobina puede ser coloreadas y cuantificadas por medio de un densitómetro. La presencia de variantes de hemoglobina puede interferir con los resultados de la prueba. Además, las hemoglobinas carbamiladas y acetiladas son medidas como la fracción de hemoglobina A_{1c} . [ref\(1152\)](#)

Los métodos que pueden usarse para medir hemoglobina A_{1c} , incluyen variaciones de los procedimientos de cromatografía por intercambio iónico y por electroforesis y los métodos inmunológicos. [ref\(1153\)](#)

Los métodos electroforéticos desarrollados para la separación de la hemoglobina A_{1c} , incluyen el enfoque isoeléctrico en gel de poliacrilamida y la electroforesis en gel de agar a pH 6.5. El electroenfoco proporciona una separación distinta de la hemoglobina A_{1c} de la hemoglobina A_0 pero el método requiere para la cuantificación, de un técnico habilidoso y de un densitómetro de alta calidad. La separación electroforética en gel de agar produce un separación más amplia de la hemoglobina A_{1c} de las otras especies de hemoglobina, y la cuantificación es mucho más fácil. [ref\(1154\)](#)

La aplicación de la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) (Tabla 32-6, método 3) para la separación de hemoglobina glicada también utiliza resina de intercambio catiónico como la fase estacionaria. Las varias fracciones de hemoglobina se separan a medida que los amortiguadores de fuerza iónica creciente pasan a través de la columna. Las concentraciones de las fracciones de hemoglobina separadas son medidas espectrofotométricamente a 415 nm a medida que dejan la columna. Los métodos por HPLC reconocen las variantes de hemoglobina tales como las hemoglobinas S, C, D y G. Como resultado, deben llevarse a cabo correcciones matemáticas antes de la interpretación para explicar estas variantes de hemoglobina. [ref\(1155\)](#)

Los métodos inmunológicos (Tabla 32-6, método 4) para medida de la hemoglobina A_{1c} , incluyen los procedimientos de radioinmunoensayo, [ref\(1156\)](#) el inmunoensayo enzimático [ref\(1157\)](#) y los procedimientos de inmunoaglutinación latex. [ref\(1158\)](#) Se han desarrollado ambos anticuerpos monoclonales que reconocen la movilidad del azúcar y cualquier número de aminoácidos en el amino N-terminal de la cadena beta100.

La medida de la hemoglobina glicada total puede lograrse por el uso de cromatografía de afinidad con ácido fenilborónico ligado a una resina inerte. El ácido borónico forma una unión covalente débil con los grupos hidroxilos de los azúcares. Las hemoglobinas glicadas fallan en ligarse a la resina y eluyen primero. La hemoglobina glicada ligada es luego eluida por la aplicación de un amortiguadores que contiene un azúcar competitivo, como el sorbitol, el cual compite con la hemoglobina glicada ligada por los sitios de unión del ácido borónico. Las hemoglobinas glicadas que se unen a la resina incluyen no solamente la hemoglobina A_{1c} sino también otras formas de hemoglobina glicada A_0 . El método es simple de llevar a cabo y es específico para la hemoglobina glicada.

Los métodos colorimétricos (Tabla 32-6, método 6) para la hemoglobina A_{1c} están basados en el hallazgo de que cuando la hemoglobina A_{1c} está sujeta a hidrólisis ácida



moderada, se libera 5-hidroxi metilfurfural (5-HMF) y puede combinarse con el ácido tiobarbitúrico para formar un producto coloreado. [ref\(1159\)](#) Este método es específico para los azúcares ligados a cetamina; de esta manera la hemoglobina F y las variantes de hemoglobina no interfieren. Los inconvenientes del procedimiento incluyen valores falsamente aumentados de la formación de 5-HMF como resultado de la condensación de glucosa (en alta concentraciones) con la hemoglobina. [ref\(1160\)](#)

Ejemplar.

Se prefieren los ejemplares anticoagulados con EDTA. La mayor parte de los métodos requieren hemolisado preparado usando un agente lisante de célula. Los ejemplares de sangre total pueden ser almacenados hasta 5 días a 2° C y 6° C.

Intervalos de referencia.

Los rangos de referencia para la hemoglobina glicada son dependientes de la especie de hemoglobina que es medida y del tipo de procedimiento que es usado. La Tabla 32-8 proporciona rangos de referencia representativa para varios tipos de métodos diferentes.

Insulina y péptido C

Steven C. Kazmierczak

Principios de análisis y uso corriente.

El inmunoensayo de unión competitiva empleando ¹²⁵I marcado (radioinmunoensayo, RIA) es todavía la técnica más ampliamente usada para medir insulina (Tabla 32-8, método 1). La determinación de insulina en los diabéticos tratados con insulina presenta problemas especiales debido a las interferencias por insulina exógena y anticuerpos para insulina circulante. [ref\(1161\)](#) La insulina, por unión no proteica o libre, es considerada la forma biológicamente activa de la molécula. Así, para el ensayo de insulina total la insulina ligada debe ser disociada de los anticuerpos antes del análisis. La disociación de la insulina de los anticuerpos de insulina exógena puede ser llevada a cabo usando precipitación ácida. La separación de la insulina ligada y la libre marcada puede ser realizada por una variedad de técnicas incluyendo la precipitación usando un segundo anticuerpo, carbón envuelto en dextrano, y polietilenglicol. [ref\(1162\)](#)

Se han desarrollado inmunoensayos no isotópicos, de unión competitiva para la insulina, algunos de los cuales están disponibles comercialmente. Estos inmunoensayos competitivos emplean marcadores de enzimas con medidas fluorométricas o luminométricas de la actividad enzimática así como marcadores fluorescentes para el uso de los inmunoensayos fluorescentes. [refs\(1163\)](#) Los reactivos usados en los inmunoensayos no isotópicos son típicamente estables durante períodos de tiempo más largos cuando se comparan con las técnicas RIA. [ref\(1164\)](#)

Un ensayo de dos tipos, inmunoensayométrico de fase sólida desarrollado por TOSOH Medics Corp., Foster City, California (Tabla 32-8, método 2), emplea anticuerpo monoclonal de ratón que ha sido inmovilizado en un molde magnético en fase sólida. El segundo, un anticuerpo monoclonal de ratón marcado enzimáticamente crea un sandwich anticuerpo/insulina/anticuerpo marcado. La velocidad de la fluorescencia producida por la hidrólisis del sustrato es directamente proporcional a la concentración de insulina dentro de la



muestra.

La tecnología de inmunoanálisis enzimático de micropartícula (IAEM) de los Laboratorios Abbot (Tabla 32-8, método 3) emplea anticuerpos monoclonales anti-insulina cubiertos de micropartículas. Una alícuota de la mezcla de reacción que contiene insulina ligada a las micropartículas cubiertas de anti-insulina es transferida a la matriz de fibra de vidrio. La matriz es lavada para remover los materiales sin unir, y el segundo anticuerpo anti-insulina conjugado con la fosfatasa alcalina se suspende en la matriz de fibra de vidrio donde se fija al complejo antígeno-anticuerpo. Después de un paso de lavado, el sustrato, el 4-metil-umbiferil fosfato, se agrega a la matriz, y la fluorescencia producida está directamente relacionada con las concentraciones de insulina dentro del ejemplar.

La determinación del péptido fijador (péptido C) de proinsulina proporciona una forma de reserva de insulina exógena secretoria en pacientes con diabetes mellitus. La insulina y el péptido C son secretados por el páncreas a través del hígado. Mientras que el hígado extrae una cantidad considerable y variable de insulina de la sangre,^{ref(1165)} casi todo el péptido C emerge del hígado para entrar a la circulación sistémica. Como resultado, el péptido-C no mide la insulina exógena y no está sujeto a interferencia significativa de los anticuerpos anti-insulina vistos en pacientes que reciben terapia por insulina.^{ref(1166)} RIA es la técnica de inmunoensayo más común en uso para la determinación del péptido C.

Todavía se plantean preguntas sobre la estandarización de los ensayos de péptido C.^{ref(1167)} Además, una reactividad cruzada menor del antisuero de péptido C con la proinsulina humana puede inclusive interferir significativamente en los inmunoensayos del péptido C si la secreción de proinsulina persiste en un paciente diabético que tiene anticuerpos para insulina circulantes inducidos por terapia con insulina.^{refs(1168)}

Especimen

El suero es un ejemplar aceptable para todos los ensayos. El plasma (EDTA y heparina) puede ser usado con algunos procedimientos de inmunoensayo. La presencia de una enzima que degrada insulina en los eritrocitos puede resultar en valores de insulina falsamente disminuidos en los ejemplares hemolisados.^{ref(1169)} Los resultados falsamente aumentados causados por anticuerpos de heterofilia o por factores reumatoideos han sido observados en los inmunoensayos que utilizan una técnica sandwich.^{ref(1170)} El suero para las determinaciones de insulina deben ser separados de los glóbulos rojos dentro de las 5 horas después de ser recogidos.^{ref(1171)} Una vez separado, la insulina es estable hasta 12 horas a temperatura ambiente, por 1 semana a 4°C y por 1 mes a -10°C.

Intervalos de referencia.

Los rangos de referencia para la insulina del suero son dependientes de factores como el tipo de ensayo usado para su medida y por el estado clínico del paciente en relación a la concentración de glucosa en sangre. Las concentraciones de insulina en pacientes en ayuno son típicamente menores que 25 µU/mL (1042 pg/mL, 0.17 pmol/mL).

Agradecimientos

Los editores desean agradecer a los anteriores contribuidores de los métodos: Nancy Gau, ácido acetoacético y ácido beta-hidroxibutírico; Mary Ellen King, hemoglobina glicada; y Michael D.D. McNeeley, insulina y péptido C.



Referencias

1. National Commission on Diabetes: *The long range plan to combat diabetes*, U.S. Department of Health Education and Welfare, no 76-1018, Bethesda, Md., 1976, National Institutes of Health.
2. Harris MR, Hadden WC, Knowler WC, et al: Prevalence of diabetes and impaired glucose tolerance and plasma levels in the U.S. population aged 20-74 yr, *Diabetes* 36:523, 1987.
3. Smith JW, Marcus FI, Serokman R, et al: Prognosis of patients with diabetes mellitus after myocardial infarction, *Am J Cardiol* 54:719, 1984.
4. Oppenheimer SM, Hoffbrand BI, Oswald GA, et al: Diabetes mellitus and early mortality from stroke, *Br Med J* 291:1014, 1985.
5. Mueckler M, Caruso C, Baldwin SA, et al: Sequence and structure of a human glucose transporter, *Science* 229:941, 1985.
6. Froguel P, Zouali H, Vionnet N, et al: Familial hyperglycemia due to mutations in glucokinase, *N Engl J Med* 328:697-702, 1993.
7. Cryer PE, Gerich JE: Glucose counterregulation, hypoglycemia, and intensive insulin therapy in diabetes mellitus, *N Engl J Med* 131:232-241, 1985.
8. Chan SJ, Keim P, Steiner DF: Cell-free synthesis of rat preproinsulin: characterization and partial amino acid sequence determination, *Proc Natl Acad Sci USA* 73:1964, 1976.
9. Unger RH, Orci L: Glucagon and the A cell, *N Engl J Med* 304:1518-1524, 1575-1580, 1981.
10. Hartmann H, Probst I, Jungermann K, et al: Inhibition of glycogenolysis and glycogen phosphorylase by insulin and proinsulin in rat hepatocyte cultures, *Diabetes* 36:551, 1987.
11. Dinneen S, Gerich J, Rizza R: Carbohydrate metabolism in non-insulin-dependent diabetes mellitus, *N Engl J Med* 327:707-713, 1992.
12. National Diabetes Data Group: Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance, *Diabetes* 28:1039-1057, 1979.
13. O'Sullivan JB, Worshop Y: Subsequent morbidity among gestational diabetes women. In Sutherland HW, Stowers M, editors: *Carbohydrate metabolism in pregnancy and the newborn*, Edinburgh, 1984, Churchill Livingstone.
14. Atkinson MA, Maclaren NK: The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus, *N Engl J Med* 331:1428-1436, 1994.
15. Krolewski AS, Warram JH, Rand LI, Kahn CR: Epidemiologic approach to the etiology of type I diabetes mellitus and its complications, *N Engl J Med* 317:1390-1398, 1987.
16. Tiwari JL, Terasaki PI: HLA and disease, New York, 1985, Springer-Verlag.
17. Baisch JM, Weeks T, Giles R, et al: Analysis of HLA-DQ genotypes and susceptibility in insulin-dependent diabetes mellitus, *N Engl J Med* 322:1836, 1990.
18. Khalil I, d'Auriol L, Gobet M, et al: A combination of HLA DQ beta Asp 57-negative and HLA DQ alpha Arg 52 confers susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus, *J Clin Invest* 85:1315, 1990.
19. Wicker LS, Miller J, Mullen Y: Transfer of autoimmune diabetes mellitus with splenocytes from nonobese diabetic (NOD) mice, *Diabetes* 35:855, 1986.
20. Gamble DR, Taylor KW: Seasonal incidence of diabetes mellitus, *Br Med J* 3:631, 1969.
21. Hinden E: Mumps followed by diabetes, *Lancet* 1:1381, 1962.
22. Johnson GM, Tudor RB: Diabetes mellitus and congenital rubella infection, *Am J Dis Child* 120:453, 1970.
23. Yoon JW, Onodera T, Jenson AB, et al: Virus induced diabetes mellitus. XI. Replication of Coxsackie B3 in human pancreatic beta cell cultures, *Diabetes* 27:778, 1978.
24. Craighead JE: Does insulin dependent diabetes mellitus have a viral etiology? *Hum Pathol* 10:267, 1979.



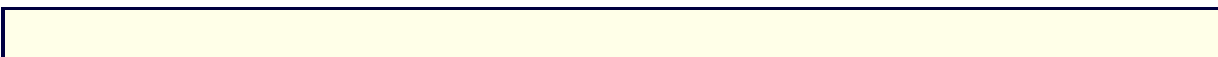
25. Kasuga M, van Obberghen E, Yamada KM, Harrison LC: Autoantibodies against the insulin receptor recognize the insulin binding subunits of an oligomeric receptor, *Diabetes* 30:354, 1981.
26. Roth RA, Cassell DJ: Insulin receptor: evidence that it is a protein kinase, *Science* 219:299, 1983.
27. Moller DE, Flier JS: Insulin resistance-mechanisms, syndromes, and implications, *N Engl J Med* 325:938-948, 1991.
28. Bar RS, Gorden P, Roth J, et al: Fluctuations in the affinity and concentration of insulin receptors on circulating monocytes of obese patients, *J Clin Invest* 58:1123, 1976.
29. Unger RH: Diabetes hyperglycemia: link to impaired glucose transport in pancreatic beta cells, *Science* 251:1200, 1991.
30. Nathan DM: Long-term complications of diabetes mellitus, *N Engl J Med* 328:1676-1685, 1993.
31. Understanding diabetic neuropathy, editorial, *Lancet* 338:1496-1497, Dec 14, 1991.
32. Bradley RF: Cardiovascular disease. In Marble A, White P, Bradley RF, Krall LP, editors: *Joslin's diabetes mellitus*, ed 11, Philadelphia, 1971, Lea & Febiger.
33. Goldberg RB: Lipid disorders in diabetes, *Diabetes Care* 4:561, 1981.
34. Lopes-Virella MFL, Stone PG, Colwell JA: Serum high den-sity lipoprotein in diabetic patients, *Diabetologia* 13:285, 1977.
35. Zierler KL, Rabinowitz D: Effect of very small concentrations of insulin on forearm metabolism: persistence of its action on potassium and free fatty acids without its effect on glucose, *J Clin Invest* 43:950, 1964.
36. The OCCT Research Group: Epidemiology of severe hypoglycemia in the diabetes control and complications trial, *Am J Med* 90:450-459, 1991.
37. Polonsky KS: A practical approach to fasting hypoglycemia [editorial], *N Engl J Med* 326:1020-1021, 1992.
38. Fischer KF, Lees JH, Newman JH: Hypoglycemia in hospitalized patients, *N Engl J Med* 315:1245-1250, 1986.
39. Miodovnik M, Mimouni F, Tsang RC, et al: Glycemic control and spontaneous abortion in insulin-dependent diabetic women, *Obstet Gynecol* 68:366-369, 1986.
40. Schwartz R: Hyperinsulinemia and macrosomia, editorial, *N Engl J Med* 323:340-342, 1990.
41. Cerami A, Stevens VJ, Monnier VM: Role of nonenzymatic glycosylation in the development of the sequelae of diabetes mellitus, *Metabolism* 28:431, 1979.
42. Makita Z, Radoff S, Rayfield E, et al: Advanced glycosylation end products in patients with diabetic nephropathy, *N Engl J Med* 325:836-841, 1991.
43. Kaneshige H: Nonenzymatic glycosylation of serum IgG and its effect on antibody activity in patients with diabetes mellitus, *Diabetes* 36:822, 1987.
44. Gabbay KH: The sorbitol pathway and the complication of diabetes, *N Engl J Med* 288:831, 1973.
45. Notvest RR, Inserra JJ: Tolrestat, an aldose reductase inhibitor, prevents nerve dysfunction in conscious diabetic rats, *Diabetes* 36:500, 1987.
46. Report on the Committee on Statistics of the American Diabetes Association: Standardization of the oral glucose tolerance test, *Diabetes* 18:299, 1969.
- 46a. Judzewitsch RG, Jaspen JB, Polonsky KS, et al: Aldose reductase inhibition improves nerve conduction velocity in diabetic patients, *N Engl J Med* 308:119-125, 1983.
47. Davidson MB: The effect of aging on carbohydrate metabolism: a review of the English literature and a practical approach to the diagnosis of diabetes mellitus in the elderly, *Metabolism* 28:688, 1979.
48. Harris MI, Hadden WC, Knowler WC, et al: International criteria for the diagnosis of diabetes and impaired glucose tolerance, *Diabetes Care* 8:562, 1985.
49. Sherwin RS: Limitations of the oral glucose tolerance test in diagnosis of early diabetes, *Primary Care* 4:255, 1977.
50. Nelson RL: Subspecialty clinics: endocrinology: oral glucose tolerance test: indications and limitations, *Mayo Clin Proc* 63:263-269, 1988.



51. Unger RH: The standard two hour oral glucose tolerance test in the diagnosis of diabetes mellitus in subjects without fasting hyperglycemia, *Ann Intern Med* 47:1138, 1957.
52. Mauer AC: The therapy of diabetes, *Am Scientist* 67:422, 1979.
53. Consensus Development Panel: Consensus statement on self-monitoring of blood glucose, *Diabetes Care* 10:95-99, 1987.
54. Gonen B, Rochman H, Rubenstein AH: Metabolic control in diabetic patients: assessment by hemoglobin A1 values, *Metabolism* 28:448, 1979.
55. Larsen ML, Hörder MN, Mogensen EF: Effect of long-term monitoring of glycosylated hemoglobin levels in insulin diabetes mellitus, *N Engl J Med* 323:1021-1025, 1990.
56. Dods RF, Bolmey C: Glycosylated hemoglobin assay and oral glucose tolerance test compared for detection of diabetes mellitus, *Clin Chem* 25:764, 1979.
57. Guthrow CE, Morris MA, Day JF, et al: Enhanced nonenzymatic glucosylation of serum albumin in diabetes mellitus, *Proc Natl Acad Sci USA* 76:4528, 1979.
58. Ward WK, Beard JC, Halter JB, et al: Pathophysiology of insulin secretion in non-insulin-dependent diabetes mellitus, *Diabetes Care* 7:491, 1984.
59. Friedemann TE, Sheft BB, Miller VC: An assessment of the value of nitroprusside reaction for the determination of ketone bodies in urine, *Q Bull Northwestern Univ Med School* 20:301-310, 1946.
60. Csako G, Benson CC, Elin RJ: False-positive ketone reactions in CAP surveys, *Clin Chem* 39:915-917, 1993.
61. Poon R, Hinberg I: One-step elimination of interference of free-sulphydryl-containing drugs with Chemstrip ketone readings, *Clin Chem* 36:1527-1528, 1990.
62. Poon R, Hinberg I, Peterson RG: N-Acetylcysteine causes false-positive ketone results with urinary dipsticks, *Clin Chem* 36:818-819, 1990.
63. Csako G: False-positive results for ketone with the drug mesna and other free sulphydryl compounds, *Clin Chem* 33:289-292, 1987.
64. Csako G: Causes, consequences, and recognition of false-positive reactions for ketones, *Clin Chem* 36:1388-1389, 1990.
65. Schulke RE, Johnson RE: A colorimetric method for estimating acetoacetate, *Am J Clin Pathol* 43:539-543, 1965.
66. Williamson DH, Mellanby J, Krebs HA: Enzymatic determination of D(-)- β -hydroxybutyric acid and acetoacetic acid in blood, *Biochem J* 82:90-96, 1962.
67. Price CP, Lloyd B, Alberti KGMM: A kinetic spectrophotometric assay for rapid determination of acetoacetate in blood, *Clin Chem* 23:1893-1897, 1977.
68. Yamanishi H, Iyama S, Yamaguchi Y, Amino N: Stability of acetoacetate after venesection, *Clin Chem* 39:920, 1993.
69. Kundu SK, Judilla AM: Novel solid-phase assay of ketone bodies in urine, *Clin Chem* 37:1565-1569, 1991.
70. Greenberg LA, Lester D: A micromethod for the determination of acetone and ketone bodies, *J Biol Chem* 154:177-190, 1944.
71. Seigel L, Robin NI, McDonald LJ: New approach to determination of total ketone bodies in serum, *Clin Chem* 23:46-49, 1977.
72. Williamson DH, Mellanby J, Krebs HA: Enzymic determination of d(-)-beta-hydroxybutyrate acid and acetoacetic acid in blood, *Biochem J* 82:90-96, 1962.
73. Hansen JL, Frier EF: Direct assays of lactate, pyruvate, beta-hydroxybutyrate and acetoacetate with a centrifugal analyzer, *Clin Chem* 24:475-479, 1978.
74. Li PL, Lee JT, MacGilliray MH, et al: Direct fixed-time kinetic assays for β -hydroxybutyrate and acetoacetate with a centrifugal analyzer or a computer-backed spectrophotometer, *Clin Chem* 26:1713-1717, 1980.
75. Dolnik V, Bocek P: Determination of pyruvate, lactate, acetoacetate and β -hydroxybutyrate in serum by



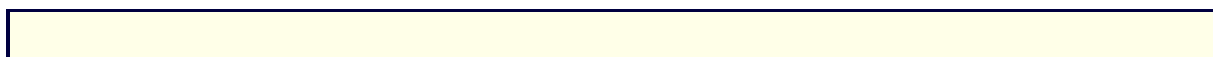
- capillary iso-tachopheresis, *J Chromatogr* 225:455-458, 1991.
76. Eckfeldt JH, Leindecker-Foster C, Kershaw MJ: Calibration of 3-hydroxybutyrate assays, *Clin Chem* 30:1116, 1984.
 77. Koch DD, Feldbruegge DH: Optimized kinetic method for automated determination of β -hydroxybutyrate, *Clin Chem* 33:1761-1766, 1987.
 78. Benedict SR: Analysis of whole blood: determination of sugar and of saccharoids (nonfermentable copper-reducing substances), *J Biol Chem* 92:141-159, 1931.
 79. Macquire GA, Price CP: Evidence of interference by ascorbate in the measurement of cerebrospinal fluid glucose by a kinetic glucose oxidase/peroxidase procedure, *Clin Chem* 29:1810-1812, 1983.
 80. Spector RN: Vitamin homeostasis in the central nervous system, *N Engl J Med* 296:1393-1398, 1977.
 81. Price CP, Spencer K: A rapid kinetic assay for glucose using glucose dehydrogenase, *Ann Clin Biochem* 16:100-105, 1979.
 82. Israngkun PP, Speicher CE: Glucose: review of methods, *Am Soc Clin Pathol* 7(3), 1991.
 83. Giampietro O, Pilo A, Buzzigoli G, et al: Four methods for glucose assay compared for various glucose concentrations and under different clinical conditions, *Clin Chem* 28:2405-2407, 1982.
 84. Banauch D, Brummer W, Ebeling W, et al: Eine Glucose-Dehydrogenase fur die Glucose-Bestimmung in Korperflussigkeiten, *Z Klin Chem Klin Biochem* 13:101-107, 1975.
 85. Pauly HEW, Pfeleiderer G: D-Glucose dehydrogenase from *Bacillus megaterium* M 1286: purification, properties and structure, *Hoppe-Seylers Z Physiol Chem* 356:1613-1623, 1975.
 86. Burrin JM, Price CP: Performance of three enzymic methods for filter paper glucose determination, *Ann Clin Biochem* 21:411-416, 1984.
 87. Meites S, editor-in-chief: *Pediatric clinical chemistry, reference values*, Washington, D.C., 1989, American Association for Clinical Chemistry.
 88. Breusch FL, Tulus R: Die Spezifitat der Mikromethoden zur Citronensaurebestimmung als Pentabromaceton, *Biochim Biophys Acta* 1:77, 1947.
 89. Roth M: "Glycated hemoglobin," not "glycosylated" or "glucosylated" [Letter], *Clin Chem* 29:1991, 1983.
 90. Hodge JE: The Amadori rearrangement, *Adv Carbohydr Chem* 10:169, 1955.
 91. Shapiro R, McManus MJ, Zalut C, et al: Sites of non-enzymatic glycosylation of human hemoglobin A, *J Biol Chem* 255:3120, 1980.
 92. Abraham EC, Huff TA, Cope ND, et al: Determination of the glycosylated hemoglobins (HbA₁) with a new microcolumn procedure, *Diabetes* 27:931-937, 1978.
 93. Menard L, Dempsey ME, Blankstein LA, et al: Quantitative determination of glycosylated hemoglobin A₁ by agar gel electrophoresis, *Clin Chem* 26:1598-1602, 1980.
 94. Rosenthal MA: The effect of temperature on the fast hemoglobin test system, *Hemoglobin* 3:215, 1979.
 95. Goldstein DE, Little RR, Wiedmeyer H, et al: Glycated hemoglobin: methodologies and clinical applications, *Clin Chem* 32:B64-B70, 1986.
 96. Fluckiger R, Harmon W, Meier W, et al: Hemoglobin carbamylation in uremia, *N Engl J Med* 304:823, 1981.
 97. Hoberman HD, Chiodo SM: Elevation of the hemoglobin A₁ fraction in alcoholism, *Alcoholism: Clin Exp Res* 6:260, 1982.
 98. Weykamp CW, Penders TJ, Muskiet FAJ, et al: Influences of hemoglobin variants and derivatives on glycohemoglobin determinations as investigated by 102 laboratories using 16 methods, *Clin Chem* 39:1717-1723, 1993.
 99. Javid J, Pettis PK, Koenig RJ, et al: Immunologic characterization and quantification of haemoglobin A_{1c}, *Br J Haematol* 38:329, 1978.
 100. John WG, Gray MR, Bates DK, et al: Enzyme immunoassay: a new technique for estimating hemoglobin A_{1c}, *Clin Chem* 39:663-666, 1993.
 101. Pope RM, Aps JM, Page MD, et al: Immunologic characterization and quantification of haemoglobin



- A_{1c}, *Diabetic Med* 10:260-263, 1993.
102. Fluckiger R, Winterhalter KH: Glycosylated hemoglobins. In Labie D, Poyart C, Rosa J, editors: *Molecular interactions of hemoglobin*, vol 70, Paris, 1977, Institut de la Santae et de la Recherche Maedicale, pp 319-326.
 103. Kennedy AL, Mehl TD, Merimee TJ: Non-enzymatically glycolated serum proteins: spurious elevation due to free glucose in serum, *Diabetes* 29:413, 1980.
 104. Myrick JE, Gunter EW, Maggio VL, et al: An improved radioimmunoassay of C-peptide and its application in a multi-year study, *Clin Chem* 35:37-42, 1989.
 105. Arnqvist H, Ollson PO, von Schneck H: Free and total insulin as determined after precipitation with polyethylene glycol: analytical characteristics and effects of sample handling and storage, *Clin Chem* 33:93-96, 1987.
 106. Tsuji A, Maeda M, Arakawa H, et al: Enzyme immunoassay of hormones and drugs by using fluorescence and chemiluminescence reaction. In Dal SB, editor: *Enzyme labeled immunoassay of hormones and drugs*, Berlin, New York, 1978, Walter de Gruyter & Co.
 107. Yamaguchi Y, Hayashi C, Miyai K: Fluorescence polarization immunoassay for insulin preparations, *Anal Lett* 15:731-737, 1982.
 108. Toivonen E, Hemmilda I, Marniemi J, et al: Two-side time-resolved immunofluorometric assay of human insulin, *Clin Chem* 32:637-640, 1986.
 109. Andersen L, Dinesen B, Jörgensen PN, et al: Enzyme immunoassay for intact human insulin in serum or plasma, *Clin Chem* 39:578-582, 1993.
 110. Koskinen P: Nontransferability of C-peptide measurements with various commercial radioimmunoassay reagents, *Clin Chem* 34:1575-1578, 1988.
 111. Malmquist J, Birgerstam G: Assays of pancreatic B cell secretory products: utility in investigative and clinical diabetology, *Scand J Clin Lab Invest* 46:705-713, 1986.
 112. Duckworth WC, Hamel FG, Bennett R, et al: Human red blood cell insulin degrading enzyme and rat skeletal muscle insulin protease share antigenic sites and generate identical products from insulin, *J Biol Chem* 265:2984-2987, 1990.
 113. Boscato LM, Stuart C: Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays, *Clin Chem* 34:27-33, 1988.
 114. Walters E, Henley R, Barnes I: Stability of insulin in normal whole blood, *Clin Chem* 32:224, 1986.
 115. Kimura M, Kobayashi K, Matsuoka A, et al: Head-space gas chromatographic determination of 3-hydroxybutyrate in plasma after enzymic reactions, and the relationship among the three ketone bodies, *Clin Chem* 31:596-598, 1985.
 116. Brega A, Villa P, Quadrini G, et al: High-performance liquid chromatographic determination of acetone in blood and urine in the clinical diagnostic laboratory, *J Chromatogr* 553:249-254, 1991.
 117. Jerrard D, Verdile V, Yealy D, et al: Serum determinations in toxic isopropanol ingestion, *Am J Emerg Med* 10:200-202, 1992.
 118. Drews PA: Carbohydrate derivatives and metabolites. In Henry RJ, Cannon D, Winkelman JW, editors: *Clinical chemistry: principles and techniques*, ed 2, Hagerstown, Md., 1974, Harper & Row.
 119. Peden VH: Determination of individual serum "ketone bodies," with normal values in infants and children, *J Lab Clin Med* 63:332-343, 1964.

Tablas

Tabla 32-1. Clasificación del NIH de la diabetes y de otras categorías de la intolerancia a la glucosa.



Clase	Descripción
Diabetes mellitus Tipo I (diabetes mellitus insulino dependiente[DMID])	Deficiencia de insulina (insulinopenia) Dependencia de insulina inyectada Generalmente ocurre antes de los 40 años Propenso a cetoacidosis Propenso a complicaciones diabéticas: Cataratas (6 veces mayor que en un no diabético) Neuropatía (todos muestran algunos síntomas; 10% serios) Nefropatía (40%-50% desarrollan falla renal) Angiopatia (alto riesgo para ataque y paro cardíaco)
Diabetes mellitus Tipo II (diabetes mellitus no insulino dependiente DMNID))	Niveles variables de insulina No dependiente de insulina exógena para control de hiperglucemia; a menudo individuos obesos Generalmente ocurre después de los 40 años No propensos a cetoacidosis No propensos a complicaciones diabéticas
Diabetes mellitus secundaria	Diabetes causada por varias condiciones secundarias tales como enfermedad pancreática, acromegalia, síndrome de Cushing, feocromocitoma, glucagonoma, somatostatinoma, aldosteronismo primario, enfermedad severa del hígado, y ciertas drogas, productos químicos y hormonas.
Tolerancia disminuida de la glucosa	Personas con niveles de glucosa plasmática intermedios entre el límite superior de los niveles normales y definitivamente diabéticos (1100-1400 mg/L) y personas con una prueba de tolerancia anormal de la glucosa pero sin evidente hiperglucemia
Diabetes mellitus general	Gestacional diabetes que tiene lugar durante el embarazo
Clases estadísticas de riesgos; anormalidad previa de tolerancia a la glucosa	Hiperglucemia transitoria previa que ocurre ya sea espontáneamente o en respuesta a estímulos específicos pero con una prueba que se de presentan normales
Anormalidad potencial de tolerancia a la glucosa	Personas que no exhiben indicaciones de diabetes pero que se encuentran en



riesgo sustancialmente potencial para contraer diabetes en el futuro; incluye gemelos monoigóticos de un diabético DMNID; persona que tiene padres, hermanos o descendiente que son diabéticos DMNID; individuos obesos; miembros de ciertos grupos raciales o étnicos con alta prevalencia de diabetes

Tabla 32-2. Comparación de cuatro criterios para evaluación de la prueba de tolerancia oral de glucosa.

Tiempo de extracción sanguínea	Niveles de glucosa plasmática (mg/L)			
	Sistema de punteo de Wilkerson	Sistema Fajans-Conn	OMS	UGDP
Ayuno	>1290 (1)*	—	>1390	Suma
1	>1940(1/2)*	>1840	—	Suma
1½	—	>1640	—	
2	>1390 (1/2)*	>1390 >2000 (diabetes)	1400-200 (UGT)	Suma
3	>1290 (1/2)*	—	—	Suma
UGDP, Programa Universitario del Grupo de Diabetes; OMS, Organización Mundial de la Salud. * Puntos dados en el sistema de Punto Wilkerson.				

Tabla 32-3. Componentes de la hemoglobina glucosilada en diabéticos y en no-diabéticos.

Fracción de hemoglobina glucosilada	Porcentaje de hemoglobina total	
	No-diabéticos	Diabéticos
A _{1a1} (lábil + estable)	0.19 ± 0.02	0.20 ± 0.03
A _{1a2} (lábil + estable)	0.19 ± 0.4	0.22 ± 0.04
A _{1b} (lábil + estable)	0.48 ± 0.15	0.67 ± 0.3
A _{1c} (por cromatografía líquida de alta eficacia)		
Lábil + estable	3.3 ± 0.3	7.5 ± 2.0
Lábil	3.2	6.9
Estable	96.8	93.1

Tabla 32-4. Métodos para el análisis de cetonas.

Método:	1. Colorimétrico
Compuesto :	Acetoacetato, acetona
Tipo de análisis:	Semicuantitativo
Principio:	$\text{Na}_2\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO} + \text{Acetona/acetoacetato}$ → color púrpura
Uso:	Más común;
Comentarios:	Sensibilidad para el acetoacetato 5 veces mayor que para la acetona
Método:	2. Enzimático
Compuesto :	AcBc, β -HB
Tipo de análisis:	Cuantitativo
Principio:	$\text{NADH} + \text{H}^+ + \text{AcAc}$ <p style="text-align: center;">pH 7.0</p> <p style="text-align: center;">→</p> <p style="text-align: center;">β-hidroxibutirato</p> <p style="text-align: center;">deshidrogenasa</p> <p style="text-align: center;">←</p> <p style="text-align: center;">pH 8.5-9.5</p> <p style="text-align: center;">β-HB + NAD^+</p>
Uso:	Raro; procedimiento no útil para análisis rápido
Comentarios:	Precisión excelente; fácil de automatización; rápido, preciso, Volumen pequeño de la muestra
Método:	3. Cromatografía gaseosa
Compuesto :	Acetona (AcAc, β -HB por cálculo)
Tipo de análisis:	Cuantitativo
Principio:	La acetona se detecta por detector de ionización de llama; AcAc es convertido a acetona por calor
Uso:	Raro; no útil como análisis rápido
Comentarios:	Acetoacetato cuantificado por sustracción de la acetona no calentada a partir de la acetona calentada.
Método:	4. Electroforesis capilar
Compuesto :	β -HB
Tipo de análisis:	Cuantitativo
Principio:	Separación electroforética de β -HB
Uso:	Raro
Comentarios:	Equipo especializado
<i>AcAc</i> , Acetoacetato; <i>β-HB</i> , Acido beta-hidroxibutirato	

Tabla 32-5. Métodos para análisis de glucosa.

Método:	1. Benedict (reducción de cobre)
Principio de análisis:	Basado en la habilidad de la glucosa para reducir el ion cúprico (Cu^{++}) a ion cuproso (Cu^+): $\text{Cu}^{++} + \text{Glucosa} \longrightarrow \text{Cu}_2\text{O (rojo)} + \text{CuOH (amarillo)}$
Uso:	Frecuentemente usado como prueba semicuantitativa para azúcares reductores totales en la orina
Comentarios:	Usado con procedimiento más específico para glucosa a fin de diferenciar glucosuria a partir de otros azúcares en la orina.
Método:	2. Glucosa oxidasa (consumo de oxígeno)
Principio de análisis:	$\text{Glucosa} + \text{O}_2 \longrightarrow \text{Ácido glucónico} + \text{H}_2\text{O}_2$ El H_2O_2 es consumido en reacciones colaterales El consumo de O_2 se mide polarográficamente
Uso:	Utilizado frecuentemente
Comentarios:	Automatizado exacto y preciso
Método:	3. Glucosa oxidasa acoplada a reacción enzimática ("Trinder")
Principio de análisis:	$\text{Glucosa} + \text{O}_2 \longrightarrow \text{Acido glucónico} + \text{H}_2\text{O}_2$ $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{colorante reducido} \longrightarrow \text{colorante oxidado (coloreado)} + \text{H}_2\text{O}$
Uso:	Automatizado frecuentemente usado en suero y orina
Comentarios:	Reacción indicadora sujeta a interferencia; de otro modo buena exactitud y precisión
Método:	4. Hexocinasa acoplada a reacción enzimática
Principio de análisis:	$\text{Glucosa} + \text{ATP} \longrightarrow \text{Glucosa-6-fosfato} + \text{ADP}$ $\text{Glucosa-6-P} + \text{NADP}^+ \longrightarrow \text{6-fosfogluconato} + \text{NADPH} + \text{H}^+$
Uso:	Aumento en la absorbancia a 340nm directamente relacionado con la concentración de glucosa
Comentarios:	Método en uso más común; muy buena exactitud y precisión
Método:	5. Glucosa deshidrogenasa
Principio de análisis:	$\text{Glucosa} + \text{NAD}^+ \longrightarrow \text{D-Gluconolactona} + \text{NADH} + \text{H}^+$ El aumento en la absorbancia a 340 nm está directamente relacionado con las concentraciones de glucosa
Uso:	Raramente usado
Comentarios:	Puede ser automatizado Buena exactitud y precisión

Tabla 32-6. Métodos de análisis de hemoglobina glicada (GHb).

Método	Base para la separación de Hb	Bases de análisis	Tipo de Hb glicada medida
1. Minicolumna (microcolumna)	Cromatografía de intercambio iónico	Absorbancia espectral de componentes de Hb separados	A_1^* o A_{1c}
2. Electroforesis	Diferencia de carga	Absorbancia espectral de componentes de Hb separados	A_1^* o A_{1c} ; S_1 , C_1 , S_1 , C_{1c} pueden ser también medidos
3. HPLC	Cromatografía de intercambio iónico	Absorbancia espectral de componentes de Hb separados	A_{1c}^*
4. Inmunoensayo	Afinidad por anticuerpo	EIE, IEIT, IAL	A_{1c}^{**} ; GHb lábil no se unirá
5. Minicolumna	Cromatografía por afinidad	Absorbancia espectral de componentes de Hb separados	A_{1c} + no- A_1 GHb; GHb lábil no se unirá
6. Colorimétrico	Hidrólisis ácida	Formación de productos coloreados a partir de 5-HMF y TBA	A_{1c} glicada A_0
<p><i>EIE</i>, Ensayo inmunoenzimático; <i>5-HMF</i>, 5-hidroximetil furfural; <i>HPLC</i>, cromatografía líquida de alta eficacia; <i>IAL</i>, inhibición por inmunoaglutinación látex; <i>TBA</i>, ácido tiobarbitúrico; <i>IEIT</i>, inmunoensayo por inhibición turbidimétrica.</p> <p>* Métodos 1, 2 y 3 actualmente incluyen rutinariamente un agente en el reactivo de hemólisis para remover la GHb lábil.</p> <p>**El reconocimiento de las variantes de Hb, tales como S_{1c}, es específico para anticuerpo</p>			

Tabla 32-7. Rangos de referencia para los diferentes métodos sobre hemoglobina glicada.



Método	Rango de referencia (%)	Especies de hemoglobina medidas
Cromatografía	4.9 – 7.7	Hemoglobina glicada total
Electroforesis	4.7 – 7.6	Hemoglobina A ₁
Inmunológico	4.1 – 5.3	Hemoglobina A _{1c}
Intercambio iónico	4.2 – 5.9	Hemoglobina A _{1c}

Tabla 32-8. Métodos para medición de insulina.

Método:	1. Radioinmunoensayo (RIA)
Principio:	Ioduro radiactivo marcado (¹²⁵ I) compete con la insulina en especimen por un número limitado de sitios de unión en los anticuerpos anti-insulina
Uso:	Procedimiento más frecuentemente utilizado
Comentarios:	Posible interferencia a partir de anticuerpos anti-insulina endógenos
Método:	2. Ensayo inmunoenzimométrico (EIEM))
Principio:	La insulina ligada al anticuerpo inmovilizado al soporte magnético de fase sólida. El agregado de un segundo anticuerpo marcado con FAL adicionado para formar sandwich. El sustrato fluorogénico adicionado después del paso de lavado para remover el anticuerpo marcado no ligado.
Uso:	Frecuentemente utilizado
Comentarios:	Posible interferencia a partir de los anticuerpos anti-insulina endógenos y de los anticuerpos anti-ratón humanos.
Método:	3. Inmunoensayo enzimático de micropartícula (IEEM)
Principio:	Similar al método 2, excepto que la insulina está ligada a las micropartículas cubiertas de antiinsulina transferidas a la matriz fibra de vidrio donde se agrega el conjugado anti-insulina:FAL para formar el complejo "sandwich". El fosfato de 4-metilumbeliferil es agregado como sustrato para la FAL.
Uso:	Frecuentemente utilizado
Comentarios:	Lo mismo que para el método 2
FAL, Fosfatasa alcalina	

Figuras

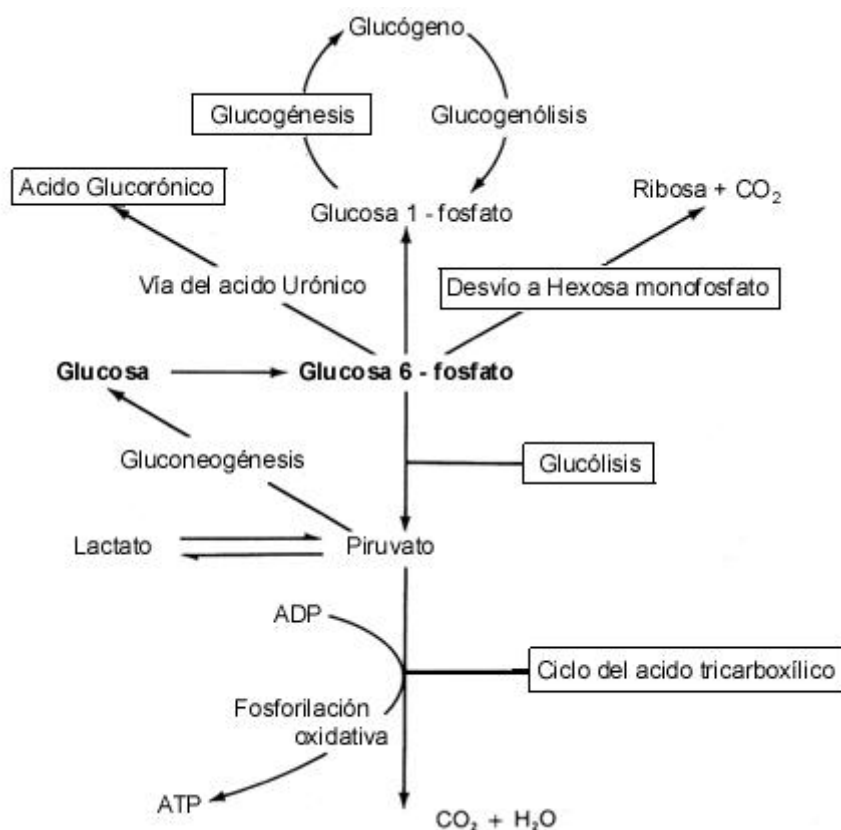
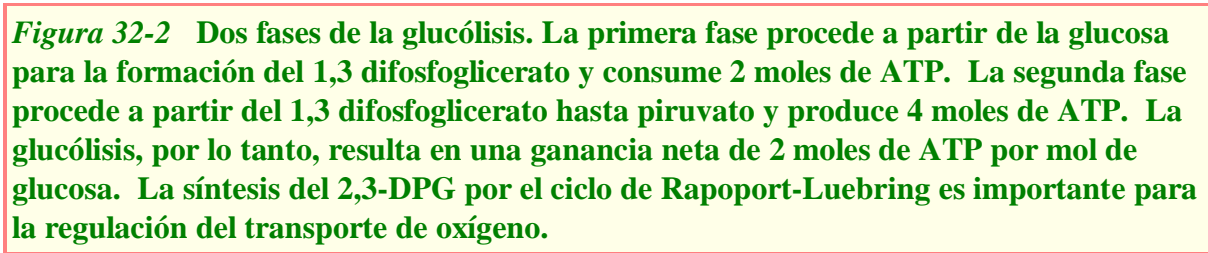
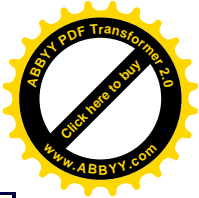


Figura 32-1 Los cinco pasos principales del metabolismo de la glucosa: glucólisis, ciclo de los ácidos tricarboxílicos, vía de la hexosa monofosfato, y vía del ácido urónico.



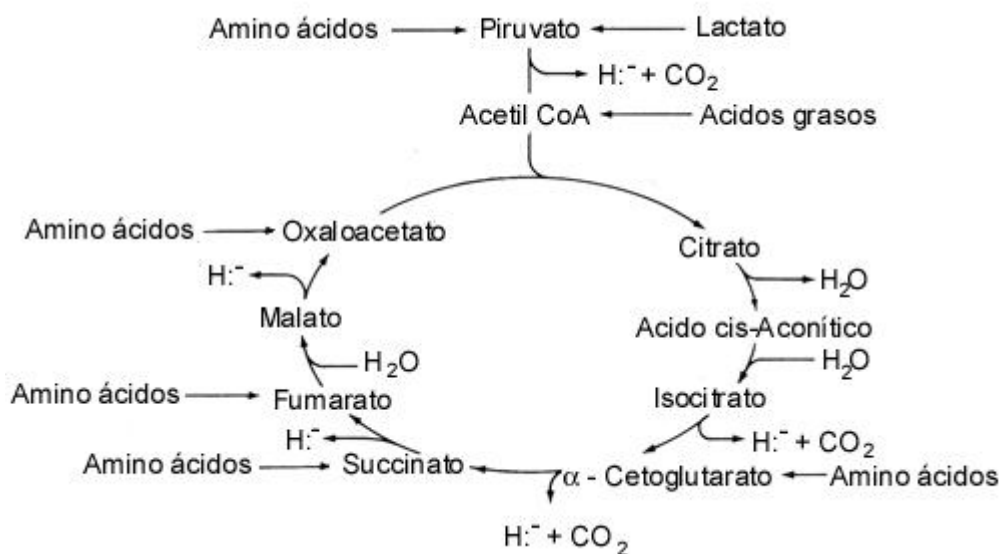


Figura 32-3 El ciclo de los ácidos tricarboxílicos produce CO_2 y agua a partir de piruvato, ácidos grasos y aminoácidos, los cuales entran al ciclo a nivel de los puntos indicados. Los iones hidruros (H^+) son generados y utilizados en el proceso de fosforilación oxidativa para producir ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico.

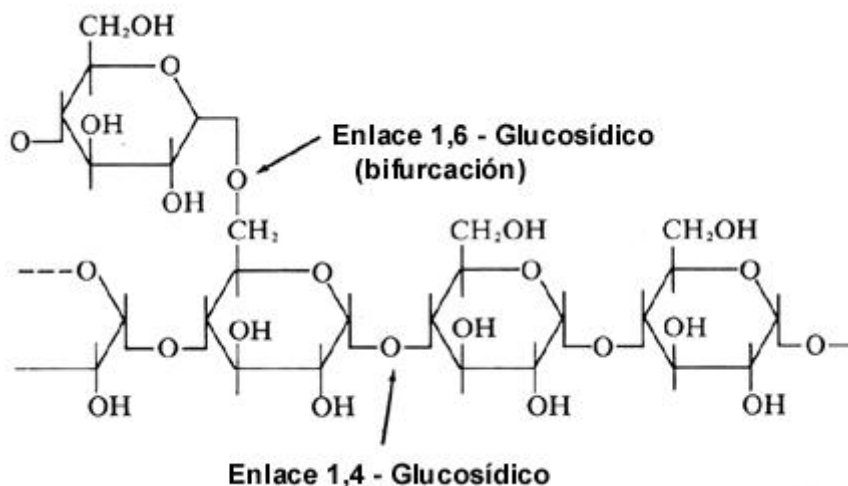


Figura 32-4 El glicógeno es un polisacárido de 1 a 4 millones de daltones compuesto de unidades de glucosa con uniones glucosídicas 1,4 y 1,6. Las uniones 1,6 producen ramificaciones a intervalos de aproximadamente 10 unidades de glucosa.

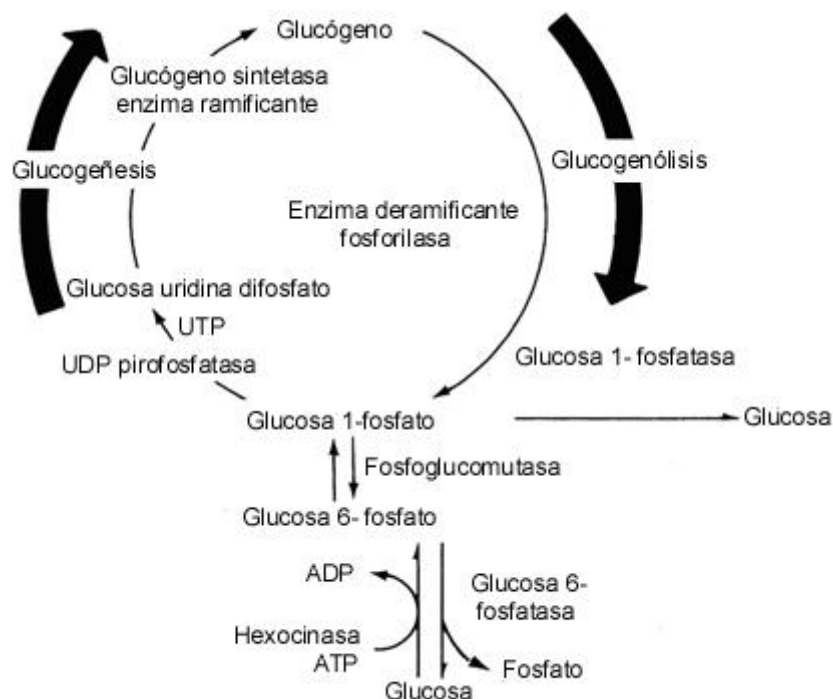


Figura 32-5 El glucógeno, la molécula de almacenamiento para la glucosa, es sintetizada a partir de glucosa-1-fosfato por un proceso llamado glucogénesis (lado izquierdo). La glucogenólisis libera unidades de glucosa a partir de glucógeno. La desramificación es el primer paso en la glucogenólisis (lado derecho)

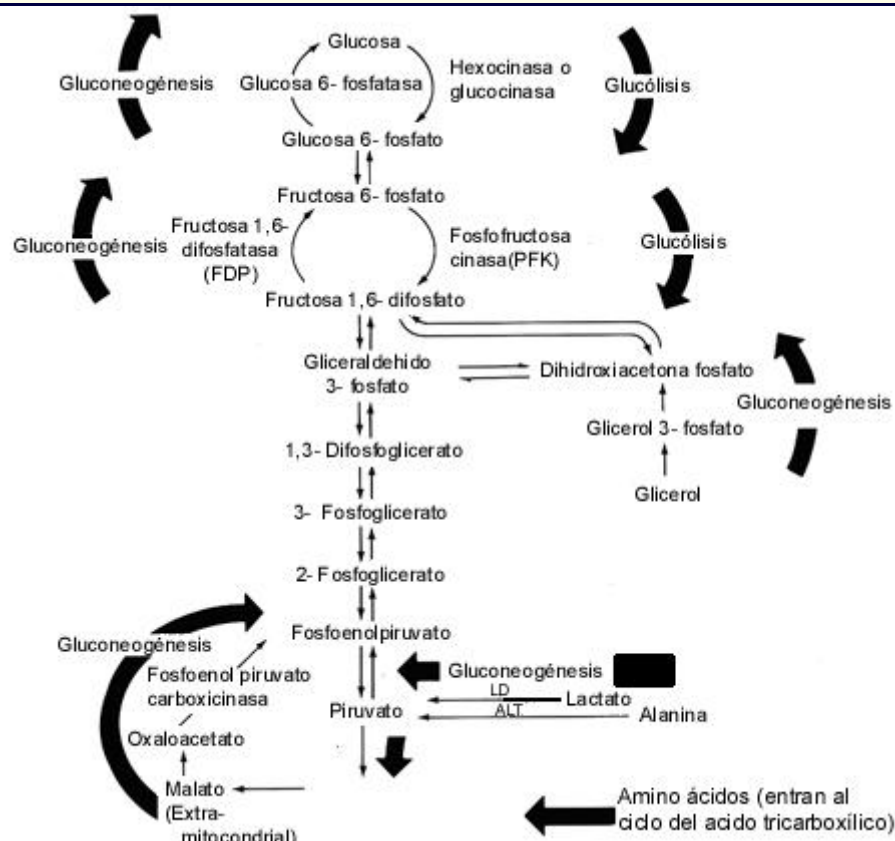
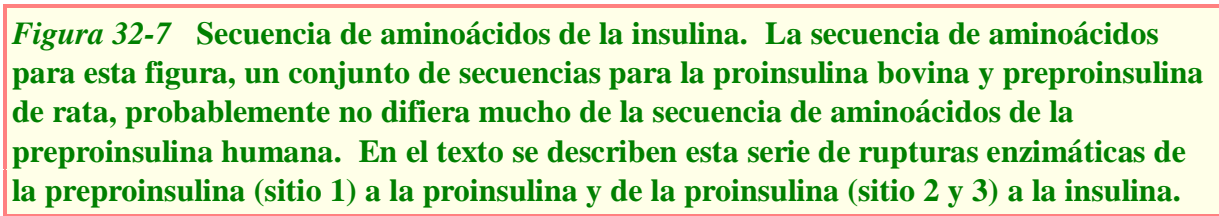


Figura 32-6 Vía involucrada en la gluconeogénesis a partir de los aminoácidos, ácidos grasos, glicerol, y lactato. Esta vía comparte muchas de las enzimas de la vía glucolítica y del ciclo de los ácidos tricarboxílicos. La gluconeogénesis proporciona glucosa en todo momento que haya escasez de glucosa y cuando se acumule lactato. *ALAT* , Alanina transaminasa; *LD*, lactato deshidrogenasa; *PC*, piruvato carboxilasa.



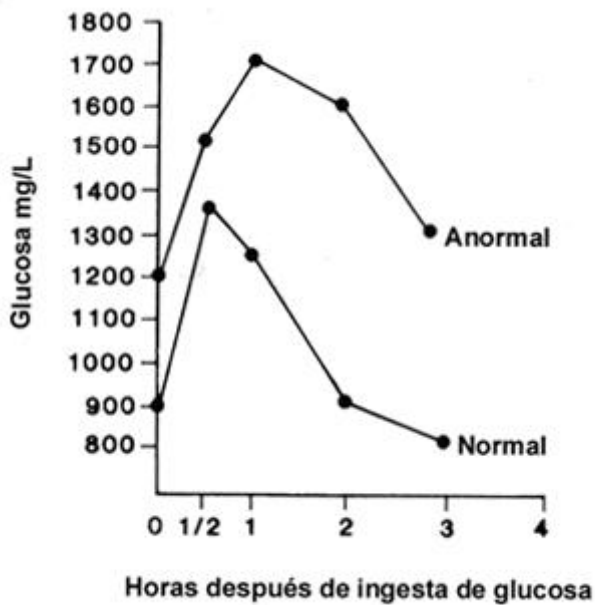


Figura 32-8 Prueba de tolerancia a la glucosa oral (PTGO, ver p. 627). La respuesta del diabético a la PTGO se compara a la respuesta normal. En la diabetes, la curva de glucosa es elevada y retardada. En la respuesta normal, el pico se alcanza después de 30 minutos y retorna al valor base después de las dos horas. La diabetes de tipo I produce una curva para la insulina prácticamente chata después de la administración de glucosa. Si hay un pico, tiene lugar tardíamente (después de una hora). En la diabetes tipo II, la respuesta a la insulina se encuentra a menudo exagerada, el pico es tardío, y el retorno al valor base es posterior a las 3 horas.

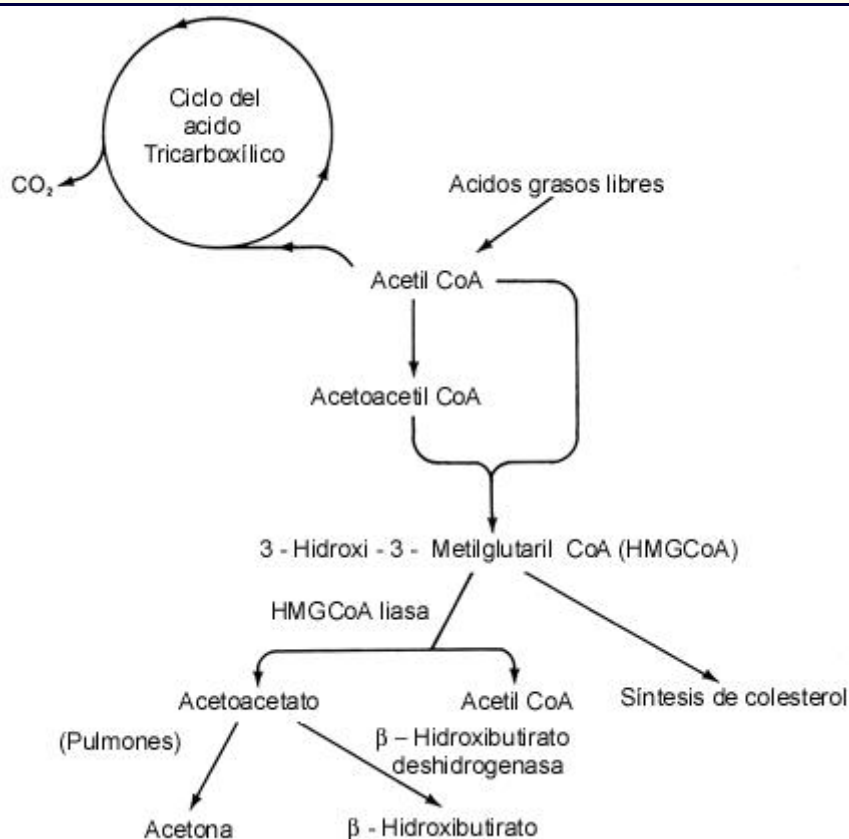


Figura 32-9 Vías involucradas en el metabolismo de los cetoácidos. La acumulación de cetoácidos, acetoacetato, y beta-hidroxibutirato es un rasgo principal de la cetoacidosis diabética. La vía metabólica que conduce al acetoacetato e hidroxibutirato a partir de la acetil CoA se encuentra acelerada en la diabetes debido a la movilización de los ácidos grasos libres.

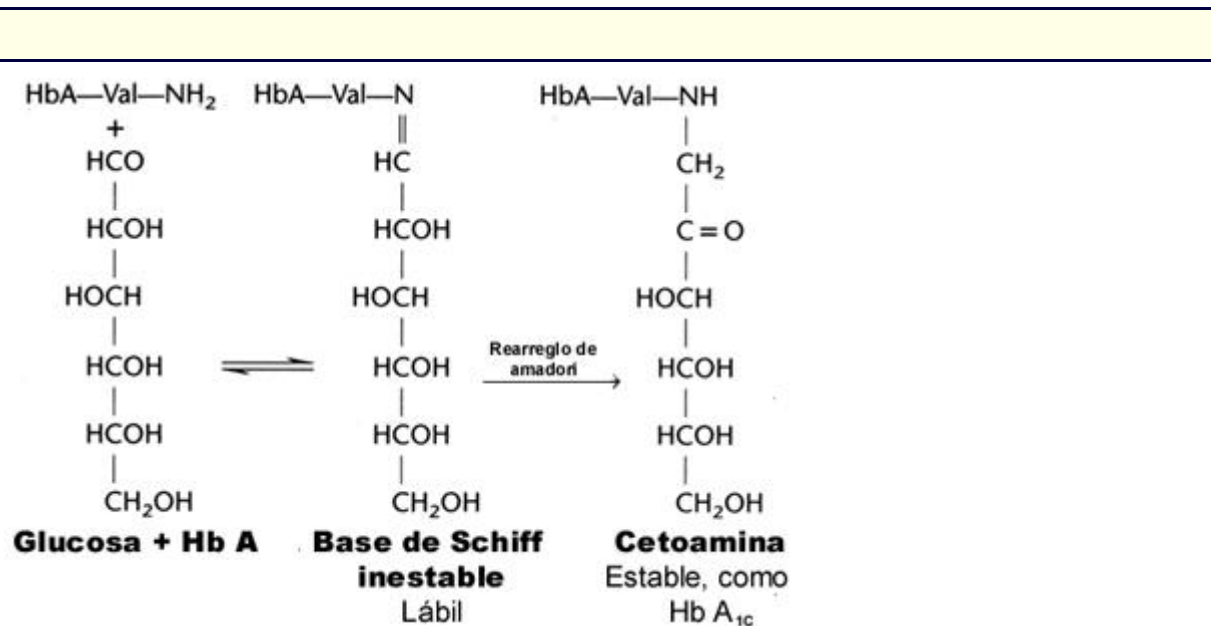


Figura 32-10 Formación de la base de Schiff para producir un producto estable.

CAPÍTULO 33

33. Enfermedades Coronario Arteriales y Desórdenes del Metabolismo Lipídico

Hebert K. Naito

PARTE I: LÍPIDOS

Fisiología normal de los lípidos

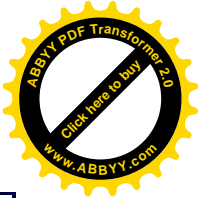
- Composición de los lípidos de los alimentos
- Digestión grasa, absorción y metabolismo de los lípidos
- Rol del hígado en el metabolismo de los lípidos

Metabolismo del colesterol

- Funciones biológicas
- Fisiología del metabolismo del colesterol
- Síntesis
- Catabolismo
- Valores normales esperados del colesterol

Metabolismo de los triglicéridos

- Funciones biológicas



Fisiología

Síntesis

Catabolismo

Valores normales esperados de triglicéridos

PARTE II: LIPOPROTEÍNAS

Clasificación de lipoproteínas

Quilomicrones

Lipoproteínas de muy baja densidad

Lipoproteínas de densidad intermedia

Lipoproteínas de baja densidad

Lipoproteínas de alta densidad

Otras lipoproteínas

Metabolismo de las lipoproteínas

Quilomicrones

Lipoproteínas de muy baja densidad

Lipoproteínas de densidad intermedia

Lipoproteínas de baja densidad

Lipoproteínas de alta densidad

Hiperlipidemia

Hiperlipoproteinemia

Clasificación de las hiperlipoproteinemias

Hiperquilomicronemia

Hiperbetalipoproteinemia

Hiperlipoproteinemia combinada

Disbetahiperlipoproteinemia

Hiperprebetalipoproteinemia

Hiperlipoproteinemia combinada

Transformación de hiperlipidemia a hiperlipoproteinemia

Limitación de la clasificación en tipos de hiperlipoproteinemias

De lípidos a lipoproteinemias: consideraciones del laboratorio

Hiperlipoproteinemias secundarias

Otras formas de dislipoproteinemias

Implicaciones clínicas de las hiperlipidemias

Enfermedades coronarias arteriales

Formación de placas ateroscleróticas

Etiología de las lesiones ateroscleróticas



El Programa Nacional de Educación del Colesterol

Métodos de análisis

Colesterol

Colesterol asociado con lipoproteínas de alta densidad (HDL)

Electroforesis de lipoproteínas

Triglicéridos

OBJETIVOS

- ◆ Describir la digestión, absorción y metabolismo del colesterol y triglicéridos, incluyendo el rol del hígado y el tejido adiposo.
- ◆ Listado de las lipoproteínas y su contenido en apolipoproteínas, funciones principales de cada lipoproteína.
- ◆ Descripción de síntesis y catabolismo de HDL, LDL, VLDL, y quilomicrones.
- ◆ Discusión sobre cada uno de los seis tipos de lipoproteínas respecto a sus niveles de lípidos y lipoproteínas, consideraciones sobre la muestra y etiología genética
- ◆ Discusión sobre la iniciación y desarrollo de la aterosclerosis.
- ◆ Discusión sobre los factores de riesgo de aterosclerosis coronaria.
- ◆ Consideraciones sobre el significado clínico de la hiperlipidemia.

Términos Clave

amfipático De amfi "a ambos lados" y patic "sentido" perteneciendo a una molécula que tiene dos sitios con propiedades características diferentes, que tiene un extremo polar (hidrófilo) y un extremo no polar (hidrófobo) pero con una longitud suficiente para que cada extremo demuestre su propia solubilidad.

apolipoproteína Proteína componente del complejo lipoproteico.

HDL Lipoproteínas de alta densidad. Estos complejos lipo-proteicos se llaman también *alfa-lipoproteínas* y son las más densas de las lipoproteínas. Su acrónimo más usado es HDL por "High-Density Lipoprotein."

IDL Lipoproteínas de densidad intermedia. Este complejo lipoproteico tiene una densidad entre VLDL y LDL, es de una vida media relativamente corta, y en la sangre de una persona sana están en muy bajas concentraciones. En personas con disbetalipoproteinemia su concentración en sangre es elevada. Su acrónimo más usado es IDL por "Intermediate-Density Lipoprotein."

LDL Lipoproteínas de baja densidad. Este complejo lipoproteico es también llamado *beta-lipoproteína* y es el producto final del catabolismo de la VLDL. Es el mayor transportador del colesterol. Su acrónimo más usado es LDL por "Low-Density Lipoprotein."

lipoproteínas Complejo lípido (apoproteína)-proteína correspondiente a unas familias de macromoléculas con conocidas propiedades físicas químicas y fisiológicas conocidas.

quilomicrones Grandes complejos lipoproteicos formados en el intestino y que tienen una importante función en el transporte de grasas (mayormente

triglicéridos dietarios).

VLDL Lipoproteínas de muy baja densidad también llamadas *pre-beta lipoproteína*. Estos son relativamente grandes complejos lípido-proteicos relativamente grandes que transportan triglicéridos de síntesis endógena. Su acrónimo más usado es VLDL por Very Low-Density Lipoprotein."

Parte I: Lípidos

Fisiología Normal de los Lípidos

Composición lipídica de los alimentos

La grasa encontradas en los alimentos está compuesta mayormente de triglicéridos alrededor de 98% a 99%, de los cuales 92% a 95% es ácidos grasos y el resto es glicerol. El restante 1% a 2% de los lípidos incluyen colesterol, fosfolípidos, diglicéridos, monoglicéridos, grasas solubles, vitaminas esteroideas, terpenos, y otras grasas. La mayoría de las grasas son mezclas de triglicéridos conteniendo cuatro o cinco ácidos grasos mayores y muchos más menores o trazas de constituyentes. Las moléculas de glicéridos individuales en la mayoría de los alimentos grasos contienen ambos ácidos grasos saturados e insaturados. Varios ácidos poliinsaturados (ácidos linoléico, linolénico, y araquidónico) no pueden ser sintetizados en el organismo y deben ser provistos por la dieta. Estos han sido llamados *ácidos grasos esenciales* (EFAs, por sus siglas en inglés)(ver Capítulo 37).

La pequeña cantidad de sustancia no hidrolizable de la grasa alimentaria consiste en esteroides, alcoholes grasos, hidrocarburos, pigmentos, ésteres de glicerol, y varios otros componentes. El colesterol está en todas las grasas animales. La mayoría de los esteroides son colesterol pero dependiendo de la dieta, otros esteroides tales como fitoesteroides pueden constituir un apreciable porcentaje del total de esteroides particularmente en poblaciones con dieta vegetariana. Los fitoesteroides son importantes ya que compiten con el colesterol en la toma de las células de la mucosa. Por eso el mayor consumo de fitoesteroides, disminuye el colesterol dietario absorbido por las células de la mucosa intestinal.

Digestión grasa, absorción y metabolismo de los lípidos

La absorción ocurre en tres fases: la *intraluminal*, o fase digestiva durante la cual las grasas dietarias son modificadas física y químicamente antes de la absorción; la *celular* o fase absorptiva en la cual el material digerido que entra en las células de la mucosa intestinal es reunido en su forma preabsortiva; y la fase de *transporte* durante la cual los lípidos son transportados desde las células de la mucosa a otros tejidos a través de los linfáticos y la sangre.^{[refs\(1172\)](#)}

Fase intraluminal

La mayor parte de la digestión de las grasas alimentarias se realiza en el intestino a través de la acción de las enzimas intestinales y pancreáticas (lipasas) y ácidos biliares (ver Capítulos 29 y 30 respectivamente). Debido a su actividad surfactante activa, las sales biliares emulsionan los triglicéridos dietarios en partículas muy pequeñas de un diámetro aproximado de 1µm. El proceso de emulsificación forma de esta manera partículas que pueden fácilmente



ser atacadas por las enzimas digestivas.

En la cavidad intestinal la acción de la lipasa pancreática origina una progresiva digestión de los triglicéridos a 1,2-diglicéridos y luego a 2-monoglicéridos y ácidos grasos. Solo un pequeño porcentaje de las grasas se hidrolizan completamente a ácidos grasos libres (FFAs, por sus siglas en inglés) y glicerol. Los ésteres del colesterol se hidrolizan a colesterol libre y ácidos grasos libres; la reacción es catalizada por la enzima colesterol esterasa.

Fase de absorción

Luego que los monoglicéridos y ácidos grasos ingresan en el retículo endoplasmático de las células de la mucosa, presuntamente por difusión, los monoglicéridos y ácidos grasos son reesterificados a triglicéridos por cualquiera de los dos caminos. La vía de los monoglicéridos característica de la mucosa intestinal y que involucra la acilación directa de los monoglicéridos absorbidos del conducto con los FFA activados. La vía del alfa-glicerofosfato presente en la mayoría de los tejidos comprende la formación de coenzima A (acyl CoA) derivada de ácidos grasos. Esta reacción la cual requiere adenosina trifosfato (ATP), es catalizada por la enzima ácido graso:CoA ligasa (AMP). Esta enzima tiene una pronunciada especificidad por ácidos grasos de cadena larga. Así los ácidos grasos de cadena larga aparecen en el ducto toráxicolinfático transportados como triglicéridos formando parte de los quilomicrones, mientras los ácidos grasos de cadena corta y media son transportados unidos a la albúmina en la circulación portal.

El porcentaje de colesterol que es absorbido de la dieta se autorregula. Niveles incrementados de triglicérido en la dieta y un depósito de ácidos biliares elevado promueven la absorción de colesterol. Cuando la ingesta continua de colesterol es menor de 300 mg./día, la mayoría es absorbido (cerca de un 40% a 60%). Si la ingesta es incrementada a 2 o 3 g/día, se absorbe una pequeña cantidad como de un 10%. En una dieta típica americana se consumen cerca de 600 mg de esteroides son consumidos por día, y el coeficiente de absorción del colesterol dietario es generalmente de 25% a 40%. Debe notarse que la absorción de colesterol tiene una gran variación individualidad. Esto puede justificar parcialmente la influencia de la dieta en la hipercolesterolemia inducida debido a la diferencia en la sensibilidad individual o falta de la misma.

Fase de transporte

Una vez que los triglicéridos han sido resintetizados en la célula de la mucosa intestinal, son ensamblados en las células de la mucosa el retículo endoplasmático y en el aparato de Golgi dentro de macromoléculas hidrosolubles denominadas *quilomicrones*. Las lipoproteínas intestinales dejan las células de la mucosa presuntamente por pinocitosis reversa. Aparecen primero en los vasos linfáticos de la región abdominal y luego en la circulación sistémica. La liberación intestinal de los quilomicrones persiste por varias horas después de la ingestión de las comidas grasas. Dado que los quilomicrones tienen un tamaño suficiente para la dispersión de la luz (hasta 0.5 micras de diámetro), el plasma se vuelve lactescente (turbio) y produce lo que comúnmente se llama *respuesta alimentaria lipémica*. Este gran complejo lípido-proteico es una mezcla de triglicéridos (82%), algunas proteínas (2% como apoproteínas) pequeñas cantidades de colesterol (9% mayormente como ésteres) y fosfolípidos (7%). Aunque la cantidad de proteínas es pequeña, hay bastante evidencias que su presencia es necesaria para la liberación de los quilomicrones. Por ejemplo, en la

abetalipoproteinemia (una enfermedad genéticamente determinada en la cual la apoproteína B no se genera en el cuerpo) los triglicéridos no son liberados de las células intestinales

La sangre transporta los quilomicrones a todos los tejidos del cuerpo, incluyendo el tejido adiposo, el cual es el principal sitio de captación. Los grandes quilomicrones, pesadamente cargados de triglicéridos (Fig. 33-1) son más bien rápidamente removidos (en minutos). Los quilomicrones están normalmente presentes en trazas, en muestras de sangres tomadas después de un ayuno nocturno.

Bajo condiciones normales, el catabolismo de los quilomicrones procede en dos fases conocidas. Al principio, los triglicéridos son hidrolizados en los tejidos extrahepáticos bajo la influencia de *triglicérido* (o *lipoprotein*) *lipasa*. Este proceso conduce a la formación de una partícula remanente, relativamente pobre en triglicérido, y rica en colesterol. En la segunda fase metabólica la partícula remanente es removida por el hígado.

La hidrólisis por la lipoprotein lipasa de las lipoproteínas del plasma rica en triglicéridos se produce en la superficie luminal (del lado de la corriente sanguínea) en los capilares endoteliales. La enzima está unida al endotelio de las células capilares en los músculos y tejido adiposo y puede ser liberada por administración intravenosa de heparina (*actividad lipolítica postheparinica*, PHLA).

Como resultado de esta primera fase del metabolismo de los quilomicrones se liberan en la circulación sanguínea ácidos grasos no esterificados en la circulación sanguínea, y los diglicéridos y monoglicéridos son tomados por las vacuolas y transportados a través de las paredes capilares para su hidrólisis.

Dentro de las células tisulares, los ácidos grasos derivados de los triglicéridos (de quilomicrones o las lipoproteínas de muy baja densidad, VLDL) pueden ser almacenados o utilizados como energía cuando se les necesite, especialmente por el corazón. Los FFAs son también usados para la síntesis celular de fosfolípidos, incluyendo la síntesis de prostaglandinas y determinadas hormonas producidas localmente.

Las partículas remanentes de quilomicrones son clarificadas por el hígado. El catabolismo adicional de las VLDL remanente ocurre en un sitio extracelular y conduce a la formación de lipoproteínas de baja densidad (LDL), una partícula rica en colesterol.

Función del hígado en el metabolismo de los lípidos

Además del intestino y otros órganos, el hígado puede sintetizar partículas de lipoproteínas a partir de los constituyentes dietarios recientemente absorbidos. De hecho el hígado es el principal órgano que puede sintetizar colesterol; de hecho alrededor del 70% de la producción diaria de colesterol proviene del hígado. La síntesis reciente de triglicéridos hepáticos se cumple por la unión con fosfolípidos colesterol y proteínas para formar las VLDL. Estas macromoléculas son entonces liberadas a la circulación y transportadas al tejido adiposo.

La síntesis de triglicéridos hepáticos es acelerada cuando la dieta es rica en exceso de calorías. Esto resulta en una sobreproducción de VLDL, lo que puede explicar las hipertrigliceridemias observadas en dietas particularmente ricas en azúcares simples.

Durante el ayuno, las vías metabólicas en el hígado son revertidas. La concentración de la glucosa sanguínea cae, y los niveles de insulina disminuyen. La síntesis hepática de triglicéridos de las VLDL disminuye en el ayuno normal. Los derivados de los FFAs del tejido adiposo son tomados por el hígado, y su oxidación a cuerpos cetónicos provee energía para la gluconeogénesis. Los FFAs originados en el tejido adiposo pueden ser esterificados a

triglicéridos, incorporados en las VLDL hepáticas, y finalmente liberadas a la circulación. Durante los períodos de estrés y en determinadas condiciones metabólicas, tales como la diabetes descompensada; las FFAs son el principal precursor de las VLDL hepáticas.

Metabolismo del Colesterol

Funciones biológicas

El colesterol es un miembro de una clase grande de compuestos biológicos llamados *esteroides* que tienen una estructura similar de cuatro anillos, el anillo ciclopentanoperhidrofenantreno (Fig. 33-2).

Debido a la bien establecida asociación positiva entre el colesterol plasmático y la enfermedad coronaria (ECC), podemos pensar en el colesterol como una sustancia nociva. Contrariamente a esta opinión el colesterol es esencial para el normal funcionamiento del organismo porque es:

1. Un componente estructural esencial de las membranas de todas las células y partículas subcelulares de todos los animales.
2. Un precursor esencial de los ácidos biliares.
3. Un precursor de todas las hormonas esteroideas. Incluyendo las hormonas sexuales y adrenales.

Fisiología del metabolismo del colesterol

El colesterol de los tejidos está en constante intercambio con el colesterol del plasma; la velocidad de intercambio y la cantidad de colesterol de los tejidos que se intercambia con el colesterol plasmático va a variar de un tejido a otro.

Dado que la pérdida y remplazo, del colesterol del organismo es alrededor del 2%, este es renovado cada día. El mayor canal de salida desde el pool, es el tracto gastrointestinal; la velocidad absoluta de recambio (en gramos por día) puede ser estimada por medida de la excreción fecal diaria que es, para el colesterol de 1 a 2 g/día, con excreción de ácidos biliares que es alrededor de la mitad del total del recambio. La Fig. 33-3 ilustra que la concentración de un pool de colesterol determinado de colesterol está bajo la influencia de las velocidades de aporte, salida y recambio de colesterol. Debería señalarse que a causa del continuo ciclo del colesterol hacia y fuera de la circulación sanguínea, su concentración plasmática, no es una simple función aditiva de la ingesta de colesterol dietario y la síntesis de colesterol endógena. Más bien refleja las velocidades de síntesis de lipoproteínas portadoras de colesterol y la eficiencia de mecanismos receptores que determinan su catabolismo. Una detallada discusión de la dinámica de la concentración de lipoproteínas puede ser hallada en la sección sobre el metabolismo de lipoproteínas.

El colesterol está presente en todas las lipoproteínas plasmáticas, pero casi un 60% del total del colesterol en plasma en ayunas es transportado en las LDL. [ref\(1173\)](#) Casi dos tercios del total del colesterol plasmático es esterificado con ácidos grasos de cadena larga, con ácido linoleico siendo el ácido graso predominante en humanos. Los ésteres de colesterol en el plasma están en estado de constante recambio debido a su continua hidrólisis y resíntesis. La hidrólisis de los ésteres de colesterol tiene lugar en el hígado, pero la síntesis ocurre mayormente en el plasma por transferencia de residuos de ácidos grasos desde lecitina al colesterol libre (Fig. 33-4). Esta reacción está catalizada por una enzima plasmática conocida

como lecitina colesterol acil transferasa o LCAT. El sustrato preferido de lipoproteico preferido de la LCAT humana es la lipoproteína de alta densidad (HDL), y parece probable que el grueso de colesterol esterificado en plasma se forma sobre HDL.^{ref(1174)} El éster de colesterol entonces es entonces transferido desde HDL a LDL VLDL, parcialmente por intercambio con los triglicéridos.

Se cree que una de las funciones de HDL es transportar el colesterol, en forma esterificada desde los tejidos hacia el hígado.^{ref(1175)} Uno puede entonces postular la siguiente secuencia de eventos. El colesterol libre desde los tejidos periféricos es transferido a la HDL; este es entonces esterificado por la LCAT, permitiendo al HDL captar más colesterol libre. El colesterol esterificado formado sobre la HDL es transferido hacia LDL y VLDL, donde es incorporado en el núcleo apolar de las moléculas de lipoproteínas. Las LDL, llevando su carga de ésteres de colesterol a los tejidos periféricos, alcanza el hígado, donde los ésteres de colesterol son hidrolizados, entrando el pool de colesterol libre en el hepatocito. El colesterol libre puede dejar el pool hepático por secreción en la bilis, directamente o luego de la conversión en ácidos biliares, o por reincorporación en la lipoproteína plasmática (VLDL). La excreción hepática por medio del pool biliar es uno de los principales mecanismos para remover colesterol desde la circulación.

Síntesis

Casi todos los tejidos animales sintetizan colesterol desde acetil CoA. En adultos el hígado y la pared intestinal proveen más del 90% del colesterol plasmático de origen endógeno. La génesis hepática de colesterol, diferente de la síntesis intestinal, es inhibida por el colesterol dietario. La velocidad de producción de colesterol (colesterol absorbido más sintetizado endógenamente), es de aproximadamente de 1g/día. En muchos tejidos la velocidad de síntesis de colesterol es determinada por la capacidad de la β -hidroxi- β -metil glutaril CoA (HMG-CoA) reductasa, la cual cataliza un paso limitante de la velocidad en la secuencia biosintética desde acetil CoA hasta colesterol. Aunque esto parezca ser la principal reacción limitante de la velocidad, podrían haber otros sitios de supresión en el camino de la biosíntesis del colesterol. La HMG-CoA reductasa hepática está sujeta a la inducción y represión por diversas hormonas, factores dietarios, y drogas. El control de la retroalimentación de la génesis del colesterol hepático está también mediada por el colesterol en sí mismo y directa o indirectamente por ácidos biliares. Un breve esquema del control de la génesis hepática del colesterol se muestra en la Fig. 33-5.

Catabolismo

En humanos, la absorción incrementada de colesterol es seguida desde el pool intercambiable por una excreción aumentada del mismo. La conversión aumentada del colesterol en ácidos biliares puede ser causada por la interrupción de la circulación enterohepática de las sales biliares. Las sales biliares que vuelven al hígado desde el intestino reprimen la síntesis de una enzima que cataliza el paso limitante de la velocidad de reacción de la conversión de colesterol en ácidos biliares. Cuando las sales biliares están impedidas de volver al hígado, la actividad de esta enzima aumenta y se estimula la degradación de colesterol en ácidos biliares. Este efecto puede ser explotado terapéuticamente en el tratamiento de la hipercolesterolemia por el uso de resinas no absorbibles, las cuales captan ácidos biliares en el lumen del intestino e impiden su retorno al hígado.

Los mecanismos recién expuestos para la excreción de colesterol por medio de ácidos biliares o colesterol en bilis dependen de una actividad mediada por receptores en el hepatocito. El hepatocito tiene sitios receptores que son específicos para apoproteínas (Apo) B y E. La función principal del hígado en el aclaramiento de lipoproteínas es remover desde el plasma las lipoproteínas que contienen Apo E (como quilomicrones remanentes y VLDL remanentes) y Apo B (como LDL) remanentes). Sin embargo, las lipoproteínas que contienen Apo-E son aclaradas con mayor eficiencia que las lipoproteínas que contienen Apo-B. Por esta razón los quilomicrones remanentes y las VLDL remanentes (lipoproteína de densidad intermedia IDL) no son normalmente cuantificables en individuos saludables (ver Fig. 33-1).

La captación de LDL por los tejidos periféricos es también mediada por receptores (ver Fig. 33-4). La unión de las LDL al receptor seguida por la internalización e hidrólisis de las LDL sirve para entregar colesterol libre a la célula. El colesterol libre intracelular entonces funciona como: (1) un regulador de la velocidad de síntesis de receptores, (2) un regulador para la síntesis de colesterol por el mecanismo de retroalimentación negativa, o (3) como regulador de la actividad de la ACAT (acil-CoA : colesterol aciltransferasa), la cual determina cuanto colesterol es almacenado en la célula como oleato de colesterol, a éster de colesterol. Se cree que uno de los factores que ocasiona el eflujo de colesterol desde la célula a la sangre es la disponibilidad de HDL.^{ref(1176)} Por este proceso, el oleato de colesterol en la célula es hidrolizado a colesterol libre y ácido graso. El hígado, el tracto gastrointestinal y otros órganos, como las glándulas adrenales y los tejidos gonadales, toman HDL y lo catabolizan en sus constituyentes proteínas y lípidos (incluyendo colesterol).

Valores normales esperados de colesterol

A diferencia de muchos de los compuestos sanguíneos que medimos en el laboratorio, los lípidos y lipoproteínas requieren un enfoque diferente dado que los valores normales esperados están siendo definidos.^{ref(1177)} El problema que surge es definir que niveles de lípidos plasmáticos separan a la población “normal” de las personas con valores elevados sanguíneos y que tienen o podrán desarrollar ECC. Antes de que se pueda determinar que es lo adecuado dieta o terapia con drogas para el control de las concentraciones de lipoproteínas y lípidos en suero, se necesitaría primero considerar el nivel al cual los lípidos sanguíneos deberían descender. En otras palabras, ¿a que nivel deberían los clínicos considerar una muestra como “hiperlipidémica”? Muchos laboratorios clínicos y médicos usaron los intervalos de referencia derivados desde el 95% de los valores centrales cuando clasificaban una muestra normal o anormal. Desafortunadamente, debido a la forma que hemos definido “normal” en el pasado, muchos resultados de pruebas de lípidos y lipoproteínas no se correlacionan muy bien con las condiciones de riesgo de enfermedad en un individuo base. De este modo valores de colesterol en el rango normal para una población dada pueden no representar un nivel de colesterol saludable. Por ejemplo, un valor de colesterol entre 2500 y 2800 mg/L puede estar dentro del 95% de la distribución de una población masculina saludable entre 51 y 59 años de edad en los Estados Unidos, pero cerca del 40% a 50% de estas personas eventualmente desarrollarían ECC.

Se han establecido los valores críticos para lipoproteínas y lípidos del suero que son altamente predictivos de enfermedad o riesgo de enfermedad, sin considerar la distribución “normal”, (ver la discusión del Programa Nacional de educación sobre colesterol pág. 669).

Debido a la correlación positiva entre concentraciones sanguíneas de colesterol y el

riesgo aumentado de ECC, muchos investigadores creen que el promedio de concentraciones de colesterol para toda la población debe ser lo mas bajo posible. De acuerdo a datos clínicos, [ref\(1178\)](#) los individuos con valores de colesterol plasmático inferior a 1800 mg/L tenían una mortalidad por ECC mínima (alrededor de 3.3/1000). Sin embargo, el riesgo relativo aumentaba al 25% para aquellos con valores entre 1800 y 2000 mg/L. Entre 2000 y 2390 mg/L el riesgo relativo aumentaba alrededor del 80%; para valores superiores a 2400 mg/L, el riesgo relativo aumentaba casi dos y medias veces, o 230%. Para individuos con concentraciones plasmáticas de colesterol cercanas a 2600 mg/L, el riesgo relativo aumentaba al 400%. En términos simples, concentraciones por debajo de 2000 mg/L pueden considerarse más ideales que concentraciones por encima de 2000 mg/L para una población adulta. Usando esto como definición, parece que cerca del 58% de la población adulta tiene niveles de concentración de colesterol indeseables. La concentración plasmática en hombres Estadounidenses jóvenes está esencialmente dentro del rango ideal. Si no aumentara con la edad, el riesgo de ECC en la población americana quizás sería mucho más inferior de lo que es ahora. Informes recientes indican que el valor promedio de colesterol en la población de Estados Unidos bajo desde 2200 a menos de 2150 mg/L, la morbilidad y mortalidad por ECC a disminuido. Otra vez, debe ser recordado que la relación entre concentraciones sanguíneas de colesterol y ECC no muestra umbral para la enfermedad.

Es bien conocido que a medida que se envejece se vuelve más susceptible al proceso arterosclerótico. Ha sido calculado que, para un individuo con un nivel de colesterol de 2000 mg/L y ningún otro factor de riesgo, un grado crítico de aterosclerosis (mayor que un 60% de estenosis) se alcanza en muchas personas al llegar a la edad de 70 años. Si el mismo individuo tiene un valor de colesterol entre 2500 y 3000 mg/L, este grado de enfermedad de las arterias coronarias (EAC) puede probablemente ser alcanzado a los 60 o 50 años de edad respectivamente. Esta guía es acelerada cuando uno considera la interacción de otros factores de riesgo para las ECC. Con la adición de un factor de riesgo de ECC, como fumar, la edad crítica es alcanzada alrededor de los 60 años de edad, y por el agregado adicional de otro factor de riesgo de ECC, hipertensión, esta edad cae a los 50 años. Una concentración plasmática de colesterol de 2500 mg/L puede mover la edad crítica por debajo de los 50 años con un factor de riesgo y a los 40 años con dos factores de riesgo. Es de resaltar el suero de una persona o la concentración plasmática de colesterol esta bajo la influencia de muchos otros factores, algunos de los cuales son controlables y algunos incontrolables. [ref\(1179\)](#)

Genética.

La genética probablemente tiene la influencia más importante en la concentración de colesterol de una persona. Se estima que cerca de la mitad de la variabilidad en concentraciones sanguíneas de colesterol tiene una base genética.

Edad.

La concentración de colesterol en el suero comienza alrededor de 650 mg/L al nacer y aumenta constantemente con la edad (cerca de 15 mg/L por año).

Sexo.

La concentración sanguínea de colesterol en hombres es generalmente siempre más alta que en mujeres premenopáusicas. Después de la menopausia, sin embargo, la



concentración de colesterol es mayor en mujeres que en hombres. Los niveles de colesterol en los hombres parece mantenerse constante entre los 50 y 60 años de edad.

Dieta.

La grasa saturada en la dieta aumenta los niveles de colesterol del suero, mientras que la grasa poliinsaturada disminuye la concentración de colesterol; las grasas monoinsaturadas tienen un menor efecto. El colesterol de la dieta eleva los niveles de colesterol del suero. Los esteroides de las plantas y ciertos tipos de fibras disminuyen la concentración del colesterol del plasma. Los aceites de pescado parecen disminuir los triglicéridos más que el colesterol.

Obesidad.

Aunque la obesidad es comúnmente mirada como un contribuyente importante para el desarrollo de hipertrigliceridemia, esta establecido que a medida que el porcentaje de individuos con obesidad aumenta con la edad, así también aumentan las concentraciones sanguíneas de colesterol.

Actividad física.

La actividad física tiende a disminuir el colesterol total del suero. Muchos de estos efectos dependen del tipo, intensidad, duración, y frecuencia de la actividad física. El ejercicio también disminuye la concentración de LDL colesterol y aumenta la del HDL colesterol.

Hormonas.

La hormona del crecimiento, tiroxina, y glucagón disminuyen los niveles de colesterol del suero, mientras que esteroides anabólicos y progestágenos aumentan los niveles de colesterol. La pérdida de estrógenos en las mujeres postmenopáusicas esta asociada con elevadas concentraciones sanguíneas de colesterol elevadas.

Enfermedades primarias.

Diabetes mellitus, disfunción de la tiroides, enfermedad obstructiva del hígado, porfiria aguda, disgamaglobulinemias, y síndrome nefrótico, tienen un efecto en las concentraciones sanguíneas de colesterol.

Metabolismo de los Triglicéridos

Funciones biológicas

Los triglicéridos son la principal forma en que se encuentran las grasas en la naturaleza, y su función prioritaria es proveer de energía a las células. Un gramo de ácidos grasos liberan alrededor de 9 kcal. El cuerpo humano almacena grandes cantidades de ácidos grasos unidos a ésteres como glicerol en el tejido adiposo. Esta forma de almacenar energía es altamente eficiente por la magnitud de energía que se libera cuando se produce el catabolismo de los ácidos grasos.

Fisiología

Los triglicéridos son por lejos la subclase más abundante de glicéridos de la naturaleza. Los tejidos de los mamíferos también contienen algunos diglicéridos y monoglicéridos, pero esto ocurre a niveles de trazas cuando se les compara con los triglicéridos. Muchas moléculas de



triglicéridos de los tejidos de mamíferos están mezcladas con glicéridos.

Debido a su insolubilidad en agua, los triglicéridos son transportados en el plasma combinados con otros lípidos más polares (fosfolípidos) y proteínas, como también con colesterol y ésteres de colesterol en complejos lipoprotéicos macromoleculares. Se demuestra que los triglicéridos esencialmente no polares (y ésteres de colesterol) se encuentran principalmente en el centro de la lipoproteína, con la proteína más polar y los componentes fosfolípidicos en la superficie, con sus grupos polares dirigidos hacia afuera para estabilizar la estructura total en el medio plasmático acuoso.

Síntesis

La concentración de triglicéridos en el plasma en un determinado tiempo es un balance entre la velocidad de entrada en el plasma y su tasa de remoción. Un cambio de concentración puede por lo tanto ser el resultado de un cambio en cada uno o ambos de estos factores. Además, un cambio primario en uno puede originar un cambio secundario en el otro. Esto, por lo tanto es el mayor problema a ser considerado en cualquier situación donde la concentración de triglicéridos es anormalmente alta, ya sea atribuible a una elevación en la velocidad de entrada, o a una caída en la velocidad de remoción de los triglicéridos plasmáticos.

Los triglicéridos del plasma derivan de dos fuentes, intestinal e hígado. Los triglicéridos intestinales son sintetizados a partir de la grasa de la dieta. La entrada hacia la sangre desde el hígado de los ácidos grasos presentes en el triglicérido depende mucho del estado, nutricional. Así en ayunas los ácidos grasos derivados de los triglicéridos de la célula adiposa son tomados por el hígado y una porción es reexcretada como VLDL. Siguiendo a una comida, los carbohidratos de la dieta son tomados por el hígado y convertidos a triglicéridos, los que son secretados como lipoproteínas. Es importante hacer notar que, excepto durante la absorción de la grasa de la dieta, el hígado es el principal contribuyente de triglicéridos al plasma.

El tamaño, contenido de triglicéridos y densidad de partícula de los complejos de lipoproteínas formados por el intestino y el hígado varía de acuerdo a la cantidad de triglicéridos que está siendo liberada. Así altas velocidades de liberación resultan en grandes complejos con una alta carga de triglicéridos y una correspondiente baja densidad. De hecho, los complejos de lipoproteínas liberados desde el hígado bajo tales condiciones pueden alcanzar un tamaño no muy inferior al de los quilomicrones intestinales aunque estos normalmente tiene un contenido de triglicéridos algo menor y por lo tanto una mayor densidad.

Catabolismo

La acción del factor aclarante de la lipasa en la superficie endotelial de células endoteliales no solo facilita la remoción de los ácidos grasos de los triglicéridos desde la sangre sino que también determina donde son utilizados, y esto tiene consecuencias importantes. Por ejemplo en un estado de exceso calórico la proporción de ácidos grasos de los triglicéridos en la circulación sanguínea en exceso respecto de la inmediata necesidad calórica es tomada por el tejido adiposo. Muchos de los ácidos grasos son reconvertidos a triglicérido intracelular y almacenados. En cambio en un estado de déficit calórico (como en el ayuno) los tejidos obtienen su energía principalmente desde la oxidación de ácidos grasos no esterificados, los que son movilizados desde el tejido adiposo y llevados a los tejidos del cuerpo por la sangre.

Quedan todavía en estas condiciones triglicéridos en la sangre en forma de VLDL, pero en vez de ser tomados por el tejido adiposo para almacenarse se dirigen lejos de este tejido hacia el músculo para complementar el abastecimiento de energía desde los ácidos grasos movilizados. Esta modificación en la toma de ácidos grasos de los triglicéridos es lograda mediante cambios en la actividad de la lipasa intracelular en los tejidos correspondientes. Así el ayuno resulta en una disminución en la actividad de la enzima en el tejido adiposo y un aumento de su actividad en el músculo.

La enzima triglicérido adiposa intracelular es diferente de la enzima de plasma y es llamada *lipasa sensible a hormona* porque es convertida de su forma inactiva a la activa por epinefrina, norepinefrina, adrenocorticotropina, hormona estimulante de la tiroides, y glucagón. Además, su actividad es estimulada por la hormona del crecimiento. Por otro lado la insulina inhibe la actividad de esta lipasa. A diferencia de la lipoprotein lipasa del tejido adiposo, la lipasa sensible a hormona de otros tejidos muestra un incremento en la actividad durante el ayuno, debido posiblemente a una disminución de los niveles de insulina. Es admitido que la lipasa hormona sensitiva juega un rol importante en la movilización de grasa desde el tejido adiposo.

Valores normales de triglicéridos esperados

Más que basarse en los tradicionales rangos tradicionales de 95 percentiles como intervalos de referencia para triglicéridos, una conferencia de consenso de la NIH recomendaba que el valor más usual para recordar es 10000 mg L o mayor, el que representa un riesgo aumentado para pancreatitis aguda.^{ref(1180)} El límite superior adulto del normal se definió como 2000mg/ l para ambos sexos, sin considerar la edad. La dificultad en la interpretación de los valores de triglicéridos es la "zona gris"; es decir trata uno como hipertrigliceridemia media si los valores están entre 2000 y 4000 mg/l?. Clínicamente tiene sentido tratar como hipertrigliceridemia media solo si la concentración de HDL colesterol del paciente está disminuida. La carencia de evidencias convincentes que los triglicéridos son un factor de riesgo primario para ECC no garantiza una intervención agresiva con tratamiento para el paciente con hipertrigliceridemia media. Sin embargo en muchos casos la disminución de triglicéridos normalizará los niveles bajos de HDL colesterol debido a la existencia de una relación inversa entre concentraciones de triglicéridos y HDL colesterol. Por otra parte, si las concentraciones de HDL colesterol están normales o sobre los límites normales(que son, 600mg/L), no hay indicación de tratamiento para el paciente con hipertrigliceridemia media.

Parte 2. Lipoproteínas

Como se discutió antes, los lípidos son insolubles en medio acuoso, incluyendo el del plasma.^{refs(1181)} Es solamente cuando los lípidos hidrofóbicos están unidos a "lipoproteínas" que se vuelven solubles en la circulación sanguínea. Debido a que las lipoproteínas son generalmente vistas como una clase de macromoléculas asociadas al transporte de lípidos, se hicieron en 1967 se hicieron recomendaciones para transferir el énfasis en el diagnóstico de hiperlipidemia a hiperlipoproteinemia.^{refs(1182)}

Una lipoproteína puede ser visualizada más simplemente como una estructura globular con una cubierta soluble exterior de proteína y fosfolípido y un interior hidrofóbica, núcleo neutro de triglicérido y colesterol (Fig. 33-6). La proteína y los fosfolípido imparten solubilidad a los lípidos insolubles. La unión entre el lípido interior y la cubierta de fosfolípido y proteína es no covalente, ocurriendo principalmente mediante puente de hidrógeno y fuerzas de van Der Waals. La proteína libre de lípidos, es llamada *apolipoproteína*. Se debe hacer notar que los lípidos, están débilmente unidos a la proteína y fosfolípido, para permitir el pronto intercambio de los mismos entre las lipoproteínas del suero, así como también entre las lipoproteínas del suero y de los tejidos, sin embargo lo suficientemente fuerte para aislarlos y clasificarlos como lipoproteínas, en los sistemas analíticos usados.

Clasificación de las Lipoproteínas

Los cuatro sistemas mas frecuentemente usados para aislar, separar y caracterizar las lipoproteínas se basan en ultracentrifugación analítica, ultracentrifugación preparativa, electroforesis, y técnicas de precipitación.^{ref(1183)} Los sistemas más frecuentemente usados son los basados en ultracentrifugación y electroforesis (Fig. 33-7). Con un papel o medio soporte de agarosa, los modelos electroforéticos muestran a los quilomicrones remanentes en el origen mientras que las pre-beta-lipoproteínas y las beta-lipoproteínas migran hacia las áreas beta₁-beta₂ globulina respectivamente y las alfa-lipoproteínas migran hacia el área alfa₁-globulina.

Usando la ultracentrifugación y tomando ventaja del hecho que las lipoproteínas son más livianas que las otras proteínas del suero, uno puede separar las lipoproteínas en quilomicrones (las lipoproteínas más livianas, con una densidad menor que la del plasma), VLDL con una densidad por debajo de 1.006 g/mL (después de la remoción de quilomicrones), LDL con una densidad entre 1.006 y 1.063 g/mL, y HDL con una densidad entre 1.019 y 1.210 g/mL.^{refs(1184)} Estas clases de lipoproteínas se correlacionan con los modelos electroforéticos; por ejemplo, la pre-beta- lipoproteína es generalmente sinónimo con la VLDL, la beta-lipoproteína con la LDL, y la alfa-lipoproteína con el HDL. La Tabla 33-1 y la Fig. 33-7 resumen las características físicas, químicas y fisiológicas de las más importantes lipoproteínas del plasma.

Quilomicrones

Los quilomicrones contienen principalmente triglicéridos combinados con colesterol, pequeñas cantidades de fosfolípidos, apoproteínas específicas (Apo B-48, A-I, A-II, C-I, C-II, C-III, y pequeñas cantidades de Apo B y E-II, E-III, E-IV) (ver Tabla 33-3). La mayoría de los modelos de la estructura del quilomicron han sido realizados bajo la suposición de que los lípidos neutros (triglicéridos y ésteres de colesterol) están parcialmente recubiertos por una capa exterior de fosfolípido, colesterol libre, y proteína. Bajo condiciones de ayuno (más de 10 o 12 horas), no se encuentran quilomicrones generalmente en la sangre de personas sanas. La presencia de quilomicrones le da al suero una apariencia de turbio o lechoso.

Lipoproteínas de muy baja densidad

Una preparación promedio de VLDL contiene 52% de triglicéridos, 18% de fosfolípidos, 22%

de colesterol, y cerca de un 8% de proteínas. El colesterol y los ésteres de colesterol se encuentran en una relación aproximada de 1:1 en peso. La esfingomielina y la fosfatidilcolina son los fosfolípidos más importantes. El mayor tamaño de una partícula de VLDL, está en relación con la mayor la proporción de triglicéridos y Apo C y la menor la proporción de fosfolípidos, Apo B, y otras apoproteínas. La Apo B parece estar presente en una cantidad absoluta constante en todas las fracciones de VLDL. La Apo B-100 da cuenta de aproximadamente un 30% a 35%, con Apo C-I, C-II, y C-III constituyendo más de un 50% del contenido de apoproteínas en la VLDL. Pueden también estar presentes Apo E-II, E-III, y E-IV y variadas cantidades de otras apoproteínas (A-I, A-II, B-48). La cantidad relativa de cada proteína varía con el individuo y con el grado de hiperlipidemia.

Lipoproteína de baja densidad

Las LDL contienen, en peso, 80% de lípidos y 20% de proteínas. Consecuente con este incremento del contenido de proteínas, la LDL es más pequeña (21 a 25 nm) y tiene una mayor densidad de hidratación (1.006 a 1.063 g/mL) que la VLDL y los quilomicrones. Aproximadamente un 50% de los lípidos de la LDL son colesterol. Las LDL constituyen entre un 40% y 50% de la masa de lipoproteínas del plasma en humanos. Su concentración promedio en un hombre adulto americano normal es cerca de 1400 mg/L, y en mujeres es de 1340 mg/L. La LDL es el principal portador de colesterol y es considerada una lipoproteína aterogénica. Apo B-100 es la principal apoproteína de la LDL normal, y la LDL Apo B de la LDL representa entre un 90% y 95% del total de Apo B-100 del plasma. La evidencia experimental sugiere que la LDL Apo B en humanos sanos deriva casi enteramente de la apoB de la VLDL en plasma. Basado en la densidad de flotación, la LDL es frecuentemente separada en dos clases, LDL₁ (o lipoproteína de densidad intermedia, IDL) y LDL₂, basados en la densidad de flotación. La fracción de densidad inferior, IDL (1.006 a 1.019g /mL), es más rica en lípido que la LDL₂ (1.019 a 1.063 g/mL) y probablemente representa a un intermediario en el catabolismo de la VLDL (ver Fig. 33-1). Así una comparación entre IDL y LDL₂ demuestra la gradual desaparición de triglicéridos y de apoproteínas más características de la VLDL (Apo C y Apo E) y un enriquecimiento con Apo B-100 y éster de colesterol.

Lipoproteína de alta densidad

El complejo macromolecular HDL (ver Fig. 33-6) contiene aproximadamente 50% de proteína y 50% de lípido. La HDL es la menor de las lipoproteínas (9 a 12 nm) y flota a la mayor densidad (1.063 a 1.21 g/mL) que ninguna de las moléculas de lipoproteína. El lípido más importante cuantitativamente de la HDL es el fosfolípido, aunque HDL colesterol tiene un interés particular. La mayor especie de fosfolípido es fosfatidilcolina (también conocida como lecitina), la cual se encuentra en un 70% a 80% del total de fosfolípidos. Tiene un importante rol funcional como reactante en la esterificación del colesterol del plasma, la cual es catalizada por la enzima lecitin-colesterol-acil-transferasa (LCAT).

La HDL puede ser además subfraccionada por ultracentrifugación diferencial en HDL₂ (con una densidad entre 1.063 y 1.110 g/mL) y HDL₃ (1.110 y 1.21 g/mL). La primera está presente en mujeres premenopáusicas en alrededor de tres veces de su concentración en los hombres. Los individuos con niveles menores de HDL₂ son aparentemente más susceptibles a ECC prematuras.

Otras lipoproteínas

Beta-lipoproteína flotante o VLDL beta-migrante.

La fracción de lipoproteína llamada *beta-lipoproteína flotante* es encontrada en personas con hiperlipoproteinemia tipo III, o “enfermedad de beta ancha” (proveniente de las regiones de mancha amplia de beta-a-pre-beta-lipoproteína frecuentemente presentes en la electroforesis del total de lipoproteínas del plasma en estos sujetos); es también llamada disbetalipoproteinemia.^{ref(1185)} Esta fracción tiene una densidad de 1.006 g/mL, lo que es una característica de la VLDL, pero tiene un modelo de migración de beta-lipoproteína. La composición anormal de lípidos de la VLDL en personas con hiperlipoproteinemia tipo III es atribuible a una cantidad proporcionalmente mayor cantidad de colesterol en esa fracción. Esta es considerada ser una lipoproteína muy aterogénica; muchos individuos con este trastorno de lipoproteína normalmente mueren por ECC entre los 20 y 30 años de edad.^{ref(1186)}

Este es un desorden genético muy raro, afectando aproximadamente a 1:10000 individuos, o menos de un 0.1% de la población. Una típica presentación clínica de esta enfermedad es el xantoma palmar (también llamado xantoma estriatum palmar). Ocasionalmente, xantomas tuberosos o tuberoeruptivos aparecen en los brazos y, menos frecuentemente, en las nalgas. Además de ECC prematura, la disbetalipoproteinemia causa enfermedad cerebral y vascular periférica. Esta anomalía bioquímica se refleja por un incremento en las IDL y quilomicrones remanentes, una relación entre VDL colesterol y VDL triglicérido mayor que 0.35, y un patrón de isoelectroenfoco demostrando la presencia de las isoformas E-II/E-II, las cuales son hoy en día la prueba de diagnóstico definitivo.

Lp(a), o lipoproteína pre-beta sumergida.

Las semejanzas entre la composición de lípidos, concentración y densidad (1.05 a 1.10 g/mL) entre Lp(a) y LDL impidieron la clara discriminación de estas dos lipoproteínas hasta que tests inmunológicos demostraron la relación entre sus residuos proteicos. Un sesenta y cinco % de la proteína Lp(a) es Apo B-100, pero otro 15% es albúmina, y el resto es una apoproteína única de la Lp (a), llamada *Apo Lp(a)*. A pesar de su alta frecuencia en la población, el significado funcional de esta lipoproteína es incierto.

Hay incrementada evidencia de que niveles altos de Lp(a) (que son, mayores que 300 mg/L) están asociados con un riesgo elevado para ECC.^{ref(1187)} Parece ser que una persona puede tener un LDL colesterol normal pero una concentración elevada de Lp(a) y tener un incremento en el riesgo para ECC. Personas con hipercolesterolemia familiar con niveles elevados de Lp(a) tienen un riesgo muy alto para ECC prematuras. Aunque cerca de un tercio del población americana tiene niveles normales o bajos de Lp(a) (menos de 100 mg/L), cerca de un 50% de la población tiene niveles elevados. La elevación de la Lp(a) ocurre tempranamente en la niñez y persiste a lo largo de la edad adulta. Los niveles de Lp(a) no son afectados por ninguna técnica de intervención en la dieta y no son sensibles a la mayoría de las drogas para disminuir lípidos, excepto para ácido nicotínico.

Lipoproteína X.

Aunque la lipoproteína X tiene una densidad de flotación similar a la de la LDL, la composición en lípido y proteína es totalmente diferente, esta lipoproteína anormal migra electroforéticamente en forma diferente que la LDL. La lipoproteína X está caracterizada por

una proporción inusualmente alta proporción de fosfolípido del plasma y colesterol no esterificado y por un bajo contenido de proteína consistiendo de Apo B, Apo C, y albúmina. Se encuentra más característicamente en el plasma de pacientes con obstrucción biliar.

Lp-X no se encuentra en personas sanas pero a menudo se encuentra en pacientes con una deficiencia familiar de la enzima LCAT y en pacientes con enfermedad obstructiva del hígado. Lp-X, ha sido usada en Europa para diferenciar colestasis de la enfermedad hepática parenquimal. No es un marcador útil para diferenciar colestasis extrahepática de la intrahepática.

Metabolismo de las Lipoproteínas

Quilomicrones

Como se discutió anteriormente, los quilomicrones se forman exclusivamente en el intestino y cruzan el sistema linfático hacia el conducto torácico donde ellos entonces entran a la circulación sistémica. La principal función de los quilomicrones es transportar triglicérido de la dieta o exógenos.

Se postula que los quilomicrones nuevamente sintetizados y secretados (de 80 a 500 nm) desde las células de la mucosa intestinal reconocen Apo C-II desde las HDL. Las Apo C-II entonces catalizan la hidrólisis de triglicéridos de lipoproteínas por la lipoproteína lipasa. La hidrólisis resulta en la liberación de FFAs y monoglicéridos.

Como se muestra en la Fig. 33-1 la hidrólisis catalizada por la lipoproteína lipasa de la célula endotelial resulta en una progresiva deprivación de triglicéridos de la molécula de quilomicron resultando en una partícula de quilomicron remanente. Esta transformación involucra el mantenimiento de la estructura de la lipoproteína por renovaciones simultáneas de fosfolípido, colesterol no esterificado, y péptidos Apo C desde la superficie de la lipoproteína al HDL del plasma. Una transferencia recíproca de ésteres de colesterol desde el HDL puede ocurrir, Apo D puede ayudar en este proceso de transferencia. La partícula de quilomicron remanente circulante es entonces liberada desde la pared capilar y aclarada desde la circulación mediante el hígado, donde es metabolizada. Esta partícula, ahora menor (entre 30 y 80 nm), retiene su éster de colesterol y Apo B y Apo E, lo que juega un papel importante en la toma de estas partículas por un mecanismo de toma por receptor hepático de alta afinidad (ver Fig. 33-4). Cuando ocurre la unión, los remanentes son inmediatamente internalizados por endocitosis mediada por receptor y degradados en los lisosomas hepáticos.

Lipoproteína de muy baja densidad

Luego del aumento postprandial en triglicéridos de quilomicrones, una subida secundaria en la concentración de triglicéridos ocurre entre las 4 a 6 horas después de una comida. Esto representa predominantemente un triglicérido de VLDL hepático sintetizado desde glucosa y triglicérido de quilomicrones no hidrolizados en el tejido periférico. La contribución relativa de la glucosa y de la grasa de la dieta varía con la composición de la dieta. El consumo de una dieta alta en carbohidratos puede conducir a un fenómeno conocido como *hipertrigliceridemia inducida por los carbohidratos*. Con una dieta alta en carbohidratos, el flujo de glucosa al hepatocito está en exceso respecto a la demanda de energía y capacidad de almacenamiento de glucógeno. Esto resulta en la modificación de la acetil CoA en la síntesis de ácidos grasos y la dihidroxiacetona fosfato en glicerol activado. Este fenómeno puede no

persistir en personas sanas, pero otros pueden ser inusualmente susceptibles a la inducción de carbohidratos de la síntesis de VLDL. Esto es una base para la reducción de los carbohidratos dietarios (azúcares simples y alcohol) en el tratamiento de la hipertrigliceridemia, pero este enfoque no es exitoso si la hipertrigliceridemia tiene otras causas, como una sobreproducción o un defecto en la depuración. Normalmente, las VLDL representan cerca de un 10% a 15% del total de la lipoproteínas circulantes en un individuo normal sano.

Se cree que los triglicéridos de la VLDL tiene un destino similar al de los lípidos de los quilomicrones (ver sección del catabolismo de quilomicrones, p.652 y por encima). Durante el catabolismo de las VLDL, más de un 90% de Apo C es transferida al HDL, mientras que esencialmente todo el Apo B permanece con la partícula de lipoproteína original. Según esta vía catabólica postulada, la ruptura de la VLDL conduce a la formación de partículas LDL ricas en colesterol. La HDL juega un rol importante al servir de aceptor de ApoC, colesterol libre y fosfolípido como exceso de superficies remanentes desde una VLDL saturada. La Apo C puede recircular desde HDL a los quilomicrones nuevamente sintetizados o a las VLDL. La vida media de la VLDL es entre 1 y 3 horas.

Lipoproteína de densidad intermedia

La IDL es una partícula transitoria (22 a 28 nm) usualmente presente in concentraciones muy bajas en el plasma de personas en ayuno. La IDL, como se discutió previamente, es un lipoproteína derivada del catabolismo de la VLDL. Las partículas de HDL interactúan con la enzima plasmática LCAT, la cual esterifica el exceso colesterol libre de HDL con ácidos grasos derivados de la posición 2-carbono de la lecitina, el principal fosfolípido del plasma. El éster de colesterol nuevamente sintetizado se retransfiere a las partículas de IDL desde las HDL, aparentemente mediante la acción de una proteína intercambiadora de éster es de colesterol del plasma (posiblemente Apo D). El resultado neto del acople de las lipólisis y las reacciones de intercambio, es el reemplazo de la mayoría del núcleo original de triglicérido de la VLDL con éster de colesterol.

Después de la lipólisis, las partículas de IDL son liberadas desde la pared capilar a la circulación. Ellas luego sufren una conversión adicional en la cual la mayoría de los triglicéridos remanentes son removidos y todas las apoproteínas excepto Apo B se pierden. La partícula resultante, que contiene éster de colesterol casi puro en el núcleo y Apo B en la superficie, es la LDL.

Lipoproteína de baja densidad

Como se discutió previamente, la formación de la LDL se produce inicialmente a partir del catabolismo de la VLDL. En una persona normal sana, el colesterol-LDL constituye cerca de dos tercios del total de colesterol plasmático; la concentración de LDL colesterol en las mujeres es ligeramente menor que en los hombres (excepto después de la menopausia). La LDL libera el colesterol al tejido extrahepático (y al hígado), donde es utilizado, depositado, o excretado.

La entrada de las partículas de LDL al tejido periférico es realizada cuando la LDL se une a los receptores de alta afinidad localizados en regiones de la membrana plasmática llamados los "hoyos" *revestidos*. Estos fosos se invaginan en la célula y se aprietan para formar una vesícula que transporta el LDL a las lisosomas (Fig. 33-4). La fusión de la membrana de la vesícula con la membrana lisosomal expone a la LDL a una serie de enzimas



hidrolíticas, las que degradan la Apo B en aminoácidos. Los ésteres de colesterol son hidrolizados por una lipasa ácida, y el colesterol libre liberado deja los lisosomas para uso en reacciones celulares. Como resultado de este mecanismo de captación, las células extrahepáticas tienen velocidades menores de síntesis de colesterol, dependiendo en cambio del colesterol derivado de LDL. El colesterol así liberado es usado para la síntesis de membrana y sirve para regular, como es, deprimir la síntesis de colesterol por la HMG-CoA reductasa. La internalización del LDL también regula la síntesis del receptor de LDL por sí mismo.

El exceso de colesterol activa la enzima acil-CoA-colesterol aciltransferasa (ACAT), conduciendo al almacenamiento intracelular de éster de colesterol. Así el resultado neto de la unión y internalización del LDL es la inhibición recíproca y activación de las enzimas de síntesis y almacenaje celular de colesterol y una reducción en el número de receptores disponibles para unir LDL.

La significación de este proceso para regular los niveles de colesterol plasmático en humanos está ilustrada en pacientes con la forma homocigota de la hipercolesterolemia familiar. Estos pacientes son deficientes en los receptores de LDL y tienen excesiva producción de LDL y un catabolismo deficiente de LDL debido a una incapacidad de los tejidos de unir, internalizar, degradar, y así regular la síntesis de colesterol. Excepto por la manifiesta deficiencia del receptor en la hipercolesterolemia familiar, es sin embargo incierto, el rol del receptor de la LDL incierto en el control final de los niveles plasmáticos de colesterol y es probablemente solo un complemento de otros procesos regulatorios. Se ha reconocido que la especificidad del receptor de LDL también se extiende a lipoproteínas que contienen Apo E y Apo B. Parece que aunque los receptores extrahepáticos toman LDL fácilmente, los receptores hepáticos toman los quilomicrones remanentes con mayor eficiencia (cerca de 20 veces más) y las LDL con mucho menor eficiencia. Esta diferencia es probablemente atribuible al contenido de Apo E en los quilomicrones remanentes y IDL, la cual tiene una mayor afinidad por el receptor que la de Apo B.

Sumándose al mecanismo normal de degradación, la vía de receptores de LDL de alta afinidad, el LDL del plasma puede ser degradado por mecanismos menos eficientes que, requieren niveles plasmáticos altos para lograr velocidades significativas de remoción. Uno de estos mecanismos ocurre en las células depuradoras (macrófagos) del sistema retículoendotelial. Cuando el nivel plasmático de LDL aumenta, estas células depuradoras degradan cantidades crecientes de LDL. Cuando se sobrecargan con ésteres de colesterol, son convertidas en células espumosas, que son componentes de las placas ateroscleróticas. En humanos, los rangos estimados de la proporción de LDL plasmático degradado por el sistema receptor de LDL está entre 33% y 66%. Lo restante es degradado por el sistema de células depuradoras y quizás por otros mecanismos aún no aclarados.

Lipoproteína de alta densidad

Las moléculas de HDL nacientes son sintetizadas en las células de la mucosa intestinal y en hepatocitos por un proceso análogo a la síntesis de VLDL y quilomicrones. Esto involucra la síntesis de lípido microsomal y proteína seguido por secreción. Durante el proceso sintético, los fosfolípidos y colesterol libre son combinados con apoproteínas específicas para formar estructuras diferentes que experimentan modificaciones en la composición y estructura después de la secreción. La más importante de estas modificaciones es la esterificación de

colesterol libre para formar éster de colesterol por una reacción catalizada por la enzima LCAT. En humanos esta es la principal fuente de éster de colesterol plasmático. Las personas con deficiencia en LCAT tienen una acumulación de estas partículas deficientes en éster de colesterol en el plasma. Este hallazgo posiblemente indica que el éster de colesterol formado en la reacción de LCAT permite la expansión de las estructuras discoidales para formar las esferas características del HDL del plasma normal. El éster de colesterol así formado puede ser transferido a la VLDL durante el catabolismo.

El perfil de apoproteína del HDL naciente es modificado concomitantemente con cambios en el contenido de lípido. Apo E es el principal componente nuevamente secretado (naciente) HDL, a diferencia del HDL plasmático, el cual es caracterizado por una predominancia de Apo A con menor contribución de Apo C y Apo E. El significado funcional de esta modificación no está completamente entendido, pero la Apo A-I es un activador de la LCAT, y esta adquisición debe facilitar todas las reacciones de la LCAT. Además, la HDL participa en la regulación del catabolismo de triglicéridos y formación de éster de colesterol por proveer los respectivos cofactores, Apo C-II para la activación y Apo C-III para la inhibición de la actividad de la lipoproteínlipasa. También la HDL normal puede equilibrar el transporte de LDL por mediación de la remoción de colesterol desde sitios periféricos a sitios degradativos y excretorios. Este rol la HDL en el transporte reverso de colesterol puede ser la base para la protección proporcionada por la HDL contra las enfermedades cardiovasculares.

La vida media plasmática del HDL en sujetos normales oscila entre 3.3 y 5.8 días. El catabolismo de la Apo A-I y Apo A-II dentro de la HDL son similares. El catabolismo del HDL está realizado en pacientes nefróticos pero disminuido en sujetos hipertriglicéridémicos, especialmente aquellos con hipercolesterolemia. Está también incrementado en sujetos con dietas altas en carbohidratos y está muy realizado en pacientes con deficiencia de HDL familiar (enfermedad de Tangier). Pareciera que el cambio en el catabolismo de HDL puede jugar un rol principal en la regulación de los niveles plasmáticos de HDL.

Hiperlipidemia

Por definición, la hiperlipidemia es una concentración elevada de lípidos en la sangre. Los lípidos plasmáticos de mayor interés son el colesterol total (colesterol libre + colesterol esterificado) y los triglicéridos. Cuando una o más de estas clases mayores de lípidos plasmáticos están elevadas, existe una condición referida a *hiperlipidemia*.

Las concentraciones de colesterol y triglicérido pueden ser usadas para detectar hiperlipoproteinemia. Como se definió previamente sobre el 90% de las personas con hiperlipidemia, como se definió previamente, tienen hiperlipoproteinemia. Las principales excepciones son individuos con excesiva cantidad de LDL cuyo colesterol plasmático es mantenido dentro de los límites por una concomitante disminución en HDL.

La NIH sugiere que el tratamiento en los Estados Unidos debería iniciarse cuando un adulto tiene un nivel de colesterol en suero por encima de 2000 mg/ L.^{refs(1188)} El límite superior de los niveles de triglicérido en suero es algo menos claro. La concentración de triglicéridos de un paciente por encima de 4000 mg/L puede ser considerada alta, y niveles por encima de 10000 mg/L pueden ser considerados indeseables debido al aumento de riesgo de pancreatitis aguda.^{refs(1189)} La terapia dietaria debe ser iniciada cuando los límites superiores

son excedidos a favor de prevenir o minimizar el desarrollo de ECC dado que la aterosclerosis raramente se produce con concentraciones de colesterol total menores que 1500 mg/L durante la vida de una persona, a menos que otros factores de riesgo estén presentes como genéticos, presión elevada, fumar y obesidad .

Hiperlipoproteinemia

La hiperlipoproteinemia es una elevación de las concentraciones de lipoproteína del suero. La clasificación de la hiperlipoproteinemia comienza con la determinación del tipo de perfil de lipoproteína anormal.[refs \(1190\)refs](#) Sin embargo, son siempre necesarios otra diferenciación y análisis, por ejemplo:

1. Separación de hiperlipoproteinemia en formas primarias y secundarias (Tabla 33-2). La forma secundaria es causada por otra enfermedad conocida que puede resultar en una manifestación de hiperlipoproteinemia secundaria que se puede presentar en cualquiera de los cinco tipos principales de perfiles de lipoproteína.
2. Diferenciación de hiperlipoproteinemia hereditaria y no hereditaria.
3. Determinación de la concentración relativa de las fracciones de lipoproteínas, que son, VLDL colesterol, LDL colesterol, y HDL colesterol.

Hay numerosos tipos de hiperlipoproteinemias, pero la mayoría de los pacientes con hiperlipidemia hereditaria tienen uno de los seis patrones comunes de lipoproteína anormal. Estos modelos están resumidos en la Fig. 33-8, donde uno puede observar que tres de las cuatro familias de lipoproteína sirven como determinantes. Estas tres familias son (1) quilomicrones, (2) VLDL, y (3) LDL (incluyendo IDL.) La clasificación fenotípica original de Fredrickson[ref\(1191\)](#) no consideró la importancia de las HDL y otras lipoproteínas discutidas en este capítulo. Debido al hallazgo epidemiológico mundialmente reciente de que hay estadísticamente una importante relación inversa entre concentración de HDL colesterol y riesgo de ECC, los laboratorios ahora determinan LDL colesterol y HDL colesterol como parte del total del perfil lípido-lipoproteína.

Clasificación de las Hiperlipoproteinemias

Aunque la clasificación de las hiperlipoproteinemias se basa en la identificación de concentraciones elevadas de lípidos sanguíneos y modelos de lipoproteína anormal (Fig. 33-8), debe enfatizarse nuevamente que cada forma de dislipoproteinemia no es una entidad homogénea desde un punto de vista genético, clínico, o patológico.

Las hiperlipoproteinemias se describen ahora en detalle algo mayor, haciendo énfasis en los aspectos de diferenciación clínica, diagnóstica, genética, bioquímico-patofisiológica, y terapéutica.[refs \(1192\)refs](#)

Hiperquilomicronemia

Este desorden de lipoproteico se caracteriza por concentraciones de triglicéridos plasmáticos muy elevados, generalmente mayores que 10000 mg/ L, como el resultado de la

quilomicronemia. La elevación ocasional en colesterol es secundaria a la pronunciada elevación en los niveles de quilomicrones, ya que estas partículas también contienen colesterol. Las LDL y HDL están frecuentemente bajas, mientras que las VLDL pueden estar ligeramente elevadas. La remoción de colesterol está reducida, y los sujetos tienen deficiencia en la actividad de la lipasa, como en la actividad lipolítica posheparina (PHLA) (específicamente la extrahepática, lipoproteínlipasa, protamina-inactivada). La hiperquilomicronemia primaria usualmente se manifiesta en sí misma tempranamente en la niñez. Aunque este desorden es generalmente primario y familiar, este patrón de lipoproteína puede ser producido por muchas otras enfermedades o estados metabólicos. Así formas secundarias de esta dislipoproteinemia deben ser excluidas (ver Tabla 33-2).

Una vez que las causas secundarias obvias son excluidas, el desorden primario puede ser confirmado por (1) la presencia de xantomas eruptivos, hepatoesplenomegalia, lipemia retinalis, dolor abdominal, y pancreatitis temprana en la vida, (2) ingesta de drogas que pueden ser causa hipertrigliceridemia secundaria, (3) presencia de niveles plasmáticos reducidos de triglicérido lipasas, (4) reducción en los niveles de triglicéridos y desaparición de quilomicronemia en una dieta libre de grasa, y (5) confirmación por tamizaje familiar de herencia como una característica autosómica recesiva.

Las drogas corrientes que disminuyen lípidos no son efectivas para disminuir los triglicéridos del suero, por lo tanto solamente una dieta baja en grasas es efectiva para tratar este desorden. Como los quilomicrones son producidos como respuesta a la ingestión de grasa en la dieta, el enfoque terapéutico es reducir la cantidad de grasa dietaria a 10% del total de calorías. Esta intervención técnica puede resultar en una disminución de los triglicéridos del suero dentro de las 24 horas. La meta primaria es disminuir los triglicéridos del suero a menos de las 10000 mg/L para reducir el riesgo del paciente para la pancreatitis aguda. La meta secundaria es además reducir los niveles de triglicéridos para normalizar los niveles de HDL colesterol. Las recomendaciones de NECP^{ref(1193)} como niveles saludables de triglicérido los menores de 2000 mg/L (Tabla 33-3).

Hiperbetalipoproteinemia

La alteración de lipoproteína hiperbetalipoproteinemia es caracterizada por concentraciones elevadas de colesterol plasmático con niveles normales frecuentemente de triglicéridos y el plasma claro. La hipercolesterolemia primaria puede ser causada por (1) sobreproducción de VLDL, (2) aumentada velocidad de conversión de VLDL en LDL, (3) LDL enriquecida con colesterol esterificado, (4) estructura defectuosa de LDL, y (5) disminución del número de receptores de LDL o en la actividad de cada célula. Se estima que cerca de un 50% de la variación de la concentración de colesterol sanguíneo en la población general tiene una base genética. El modelo de lipoproteína esta caracterizado por una elevación de las LDL con VLDL normal. Este desorden de lipoproteína es reconocido como hipercolesterolemia familiar, la que exhibe los siguientes aspectos: (1) un número deficiente de receptores funcionales de LDL en los cultivos de fibroblastos (es una característica patognómica), (2) una expresión de patrón tipo II en la infancia, (3) xantomatosis en miembros severamente afectados, y (4) prematuras ECC prematuras vistas en la tercer y cuarta década.

Los desordenes hiperbetalipoproteinémicos secundarios, como hipotiroidismo, síndrome de porfiria aguda intermitente, disgamaglobulinemias, enfermedad obstructiva del hígado, y dietas en grasas altamente saturadas y en colesterol deben ser descartados.

Una vez que la hiperlipoproteinemia secundaria ha sido descartada, el desorden primario puede confirmarse por: (1) tamizaje familiar incluyendo niños; (2) persistencia de hipercolesterolemia aún después de 8 semanas de dieta baja en colesterol (menor que 300 mg/día), altas grasa poliinsaturadas (relación de grasa poliinsaturada a saturada [P/S] encima de 1:1.2); (3) presencia de xantomas tendinosos, xantelasma, y arcos corneales; y (4) determinación de la deficiencia o defecto de receptores de LDL u otros defectos moleculares genéticamente determinados.

Un tratamiento especial se requiere frecuentemente para los niveles de colesterol muy elevados de los individuos con hipercolesterolemia familiar (HF) (5000 a 15000 mg/ L). Además de las dietas acostumbradas y tratamiento con drogas (ver debajo), la mayoría de los pacientes con HF requieren plasmaféresis cada 3 o 4 semanas para la remoción de LDL. En casos extremos, se requiere el transplante de hígado. Para hipercolesterolémicos no-HF, el primer paso de tratamiento es una dieta rigurosa baja en grasa. Si la dieta no logra reducir suficientemente el colesterol del suero, se emplea drogas para disminuir los lípidos.

La meta de una terapia con dieta es reducir el colesterol-LDL del suero mientras se mantiene una dieta nutricionalmente adecuada. El enfoque dietario recomendado se puede encontrar en los reportes del panel de tratamiento adulto (ATP) del NECP.^{refs(1194)} Las recomendaciones de ATP son para que la intervención por dietas ,deben ser en dos pasos, paso I y paso II. Estas dietas reducen progresivamente la ingesta de grasa total y saturada y colesterol y promueven la pérdida de peso en pacientes con sobrepeso. Estas dietas en etapas reducen otros riesgos para ECC por disminución de la presión sanguínea, aumentando los niveles de HDL colesterol, y disminuyendo los riesgos para diabetes. Los niveles de LDL y HDL colesterol deben ser monitoreados después de 4 a 6 semanas y luego de 3 meses de comenzada la terapia con dieta paso I. Si las meta de colesterol no son alcanzadas, el paciente puede progresar a la dieta paso II. Si la intervención con el paso II todavía no hace lograr las metas de colesterol, se puede considerar una terapia con drogas. Los agentes que disminuyen los niveles de colesterol incluyen los secuestrantes de ácidos biliares (colestiramina o colestipol), inhibidores de la HMG-CoA reductasa (como lovastatin (Mevacor), pravastatin (Pravacol), simvastatin (Zocor), fluvastatin (Lescol), ácido nicotínico, y probucol. El efecto de la terapia con drogas debe ser monitoreado a las 4 o 6 semanas y luego nuevamente a los 3 meses.

Hiperlipoproteinemia combinada

Otra forma de hiperlipidemia familiar es la hiperlipidemia familiar combinada. Sus características importantes incluyen: (1) no-anormalidad en el número de receptores de LDL funcionales en los cultivos de fibroblastos, (2) ausencia del modelo hiperbetalipoproteinémico en niños, (3) temprana expresión de hipertrigliceridemia, (4) patrones lipoprotéicos múltiples en parientes afectados, en generaciones sucesivas, y (5) hipercolesterolemia en el común de los patrones hiperbetalipoproteinicos.

Esta es la más común de las hiperlipoproteinemias primarias. El rasgo característico de este desorden es la variedad de los fenotipos de lipoproteínas dentro de una familia. Más comúnmente, los pacientes pueden tener una elevación en ambos LDL y VLDL; sin embargo, dentro de una familia, se pueden también encontrar hiperbetalipoproteinemia e hiperprebetalipoproteinemia afectando a personas diferentes. A diferencia de la hiperbetalipoproteinemia, los sujetos con hiperlipoproteinemia familiar combinada



generalmente no manifiestan su enfermedad hasta la edad adulta. Clínicamente, estos pacientes tienen una incidencia aumentada de enfermedad de las arterias coronarias (EAC). Ellos también son frecuentemente diabéticos, tienen una tendencia a la hiperuricemia, y muestran una baja incidencia a la tendinitis y xantomas tuberosos. Estos rasgos están más ligados clínicamente a la hiperprebetalipoproteinemia que a la hiperbetalipoproteinemia familiar. El modo de herencia de la hiperlipoproteinemia familiar combinada está aún en duda; sin embargo, es claramente un desorden familiar que es visto más comúnmente con este patrón lipoproteico.

Es de mencionar que sujetos con hiperbetalipoproteinemia o hiperprebetalipoproteinemia pueden también pertenecer a un grupo familiar que tiene hiperlipoproteinemia familiar combinada.

Esta enfermedad lipoproteica está caracterizada por un elevado colesterol total, LDL, triglicérido, VLDL y con la ausencia de la flotante beta-lipoproteína. Cualquier hipercolesterolemia y hipertrigliceridemia secundaria deben descartarse antes de confirmar el desorden de lipoproteína primario. El tamizaje familiar es de rigor para el reconocimiento de esta anomalía de lípidos. Un diagnóstico preciso del perfil de lipoproteínas requiere una apreciación de los factores que determinan los niveles de triglicéridos. Los estudios en poblaciones en los Estados Unidos han documentado aumentos en los niveles de triglicéridos con la edad y han indicado que alrededor de un cuarto de los hombres de mediana edad tuvieron niveles de triglicéridos que exceden los valores de corte previamente publicados. Así, aunque estadísticamente válidos, los límites críticos para concentraciones de triglicéridos pueden no representar los límites fisiológicos. Por lo tanto uno puede esperar una mayor frecuencia de hiperlipoproteinemia en grupos de mayor edad.

No deberían descuidarse los efectos posibles de los carbohidratos dietarios cuando uno evalúa este desorden de lipoproteínas. Se ha demostrado que la hipertrigliceridemia de ayuno en pacientes con este perfil metabólico de lipoproteínas puede ser atribuible con un aumento agudo en los carbohidratos dietéticos. Parece ser que valores de triglicérido mayores que 4000 mg/L son raros en pacientes con este modelo lipoproteico. Los pocos casos reportados en la literatura médica sucedieron en mujeres postmenopáusicas.

La electroforesis de lipoproteínas no es frecuentemente necesaria para el diagnóstico de este patrón. Si el perfil de hiperbetalipoproteína está presente con niveles de colesterol elevado y triglicéridos normales queda poco por aclarar con la electroforesis de lipoproteínas. Si el patrón hiperlipémico familiar combinado está presente, el procedimiento de diagnóstico decisivo es la diferenciación de éste modelo de cualquiera de los modelos beta ancha o patrón hiperprebetalipoproteinémico. Esta tarea no se aclara fácilmente con la electroforesis de lipoproteínas. También es de hacer notar que el colesterol total del plasma puede ser normal a pesar de un valor elevado de colesterol-LDL. Esta relación también sucede en la hipercolesterolemia familiar.

El modelo de beta-ancha descrito más abajo no es más considerado único y ha sido notado en casos homocigotas para la hipercolesterolemia familiar. La presencia de una discreta banda atribuible a concentraciones altas de Lp(a), o pre-beta-lipoproteína sumergida puede causar una confusión en el diagnóstico con el perfil de hiperlipidemia familiar combinada. Cuando el valor de triglicérido es normal, el aspecto del patrón beta-ancha en la electroforesis es sugestivo de la presencia de Lp(a). Así el modelo electroforético es insensible y no es una herramienta altamente específica para la diferenciación de modelos.

El tratamiento para la hiperlipoproteinemia debe ser focalizado en disminuir ambas concentraciones de colesterol-LDL y triglicéridos. Esta estrategia para disminuir LDL colesterol es discutida en la sección de hiperbetalipoproteinemia (pág. 657). La disminución de los triglicéridos y VLDL colesterol es algo diferente. Desde un punto de vista dietético, está focalizado sobre los carbohidratos y calorías (si el paciente tiene sobrepeso), requiriendo restricción alcohólica, y aumento de actividad física y logrando un peso ideal. La terapia con drogas está generalmente indicada en pacientes con concentraciones muy altas de triglicéridos (ver Tabla 33-3).^{refs(1195)} Ambos, clofibrato y gemfibrosil son efectivos en disminuir triglicéridos (de esta forma VLDL o VLDL colesterol). La droga de elección para la hiperlipoproteinemia combinada es el ácido nicotínico, puesto que es muy efectivo en disminuir ambos, colesterol (LDL colesterol) y triglicéridos (VLDL colesterol) mientras aumenta el HDL colesterol.

Disbetalipoproteinemia

La disbetalipoproteinemia (también llamada hiperlipoproteinemia beta amplia) está caracterizada por una elevación de las concentraciones plasmáticas de colesterol y triglicérido y una LDL anormal (mas específicamente IDL), la cual flota en la fracción de una densidad menor que 1.006 g/mL. Esta LDL anormal frecuentemente se combina con la banda pre-beta en la electroforesis para producir una banda *beta-ancha* (ver fig. 33-8). Para un diagnóstico preciso de disbetalipoproteinemia es necesario documentar la presencia de la beta-lipoproteína flotante por un estudio de ultracentrifugación con medida de colesterol y triglicéridos en las fracciones con una densidad por debajo de 1.006 g/mL.

Las medidas de la composición de lípido de la lipoproteínas con una densidad menor que 1.006 parece ofrecer un medio más confiables para identificar esta dislipoproteinemia que la por detección de la presencia de beta-lipoproteínas flotantes mediante la electroforesis sola. La relación clínicamente usada es el contenido en colesterol del VLDL dividido por la concentración plasmática de triglicéridos. Esta relación parece ser más útil para documentar esta hiperlipoproteinemia cuando el nivel de triglicérido es por lo menos 1500 mg/ L, pero puede estar sujeta a error cuando los triglicéridos exceden de 10000 mg/ L. Se ha sugerido que si la relación VLDL colesterol-triglicérido es de 0.30 o más, el sujeto puede tener disbetalipoproteinemia. Sin embargo, cuando la relación está entre 0.25 y 0.29, se puede considerar un diagnóstico de hiperlipoproteinemia de beta-ancha. La confirmación de este desorden se puede hacer por hallazgo de una isoforma de apoE con un patrón E₂/ E₂.

Las características clínicas de sujetos con este desorden lipoproteico varían ampliamente en función de la edad, sexo, grado de adiposidad, y presencia de un desorden asociado como hipotiroidismo y alcoholismo.

El xantoma más característico en sujetos con beta-ancha lipoproteinemia es llamado *xantoma striatum palmare* (en la literatura ambos “xantoma striatum palmare” y “xantoma striata palmaris” están en Latín impropio). En su forma más sutil estas lesiones producen una decoloración naranja o amarilla de los pliegues palmares (xantocromía striata palmaris), un fenómeno más fácilmente detectado en sujetos de complexión adecuada. Cuanto más avanzan, estas lesiones pueden producir elevaciones planas y la virtual obliteración de los pliegues palmar y digital. Las lesiones levantadas pueden ocasionalmente afectar las superficies palmares remanentes y en la forma severa producir xantomas tuberosos incapacitantes.

Se han notificado varias formas de ECC en asociación con hiperlipoproteinemia beta-ancha. La hiperlipoproteinemia es fácilmente tratada con dieta y drogas. La forma de enfermedad cardiovascular asociada con esta forma de dislipoproteinemia difiere significativamente, de la asociada con la hiperbetalipoproteinemia familiar, en la que enfermedades periféricas y aún cerebrovasculares parecen ser tan comunes como ECC.

La hiperlipoproteinemia beta amplia puede estar asociada con hipotiroidismo, gota, y diabetes mellitus y se encuentra en pacientes con falla renal aguda en tratamiento de hemodiálisis.

Hiperbetalipoproteinemia

La forma pre-beta de la hiperbetalipoproteinemia ha sido llamada *hiperlipidemia endógena* o *hiperlipidemia inducida por carbohidratos*. El último término no es más aceptado por la mayoría de los investigadores dado que se observa también una hipertrigliceridemia inducida por carbohidratos en individuos normolipémicos. La hiperlipidemia endógena excluye la poco frecuente hiperquilomicronemia pero incluye una poco común hiperlipidemia mixta exógena y endógena. (Ver más adelante).

Por definición la hiperprebetalipoproteinemia es una elevación de niveles de VLDL (y triglicéridos) por encima del arbitrario punto de corte en ausencia tanto de quilomicrones o VLDL anormal de la disbetalipoproteinemia. Los niveles de LDL son normales y la medida de Colesterol-LDL es normal.

Una tentativa de diagnóstico de este desorden lipoproteico se puede hacer si, la concentración de triglicéridos está aumentada, el colesterol total es normal o moderadamente elevado, y el estacionamiento del plasma (a 40° C por 10 a 12 horas) no revela quilomicrones. El diagnóstico bioquímico es confirmado si la electroforesis revela una banda pre-beta lipoproteína diferente y el colesterol-LDL está en los límites normales. Hay que recordar que la presencia de pre-beta con niveles normales de triglicéridos plasmáticos se produce con pre-beta-lipoproteína “sumergida” una lipoproteína aparentemente normal pobre en triglicéridos, variante observada en por encima del 35% de individuos sanos.

Una vez que el patrón bioquímico de hiperprebetalipoproteinemia ha sido confirmado (esto es basado en más de una muestra en condiciones estándar), debería ser clasificado de acuerdo a la causa, como primaria-ya sea tanto familiar como esporádica-o como secundaria a otro desorden. (ver Tabla 33-2)

El diagnóstico de enfermedad primaria depende de los siguientes criterios: (1) patrón electroforético de hiperprebetalipoproteinemia, (2) un aumento de colesterol-LDL, (3) una o más parientes en primer grado con, este desorden y (4) ausencia de parientes cercanos con otras enfermedades lipoproteicas primarias. Otras características comunes son: niveles de colesterol normal si los niveles de triglicéridos son menores de 4000 mg/l, los niveles de triglicérido debajo de 15000 mg/l y una historia familiar de diabetes.

Dado el alto consumo de alcohol en parte de la población, se hará un breve comentario. Aunque no se la considera la causa mayor de hiperlipidemia, el etanol es considerado como una causa aguda de una hipertrigliceridemia transitoria con una elevación primaria de las VLDL, causando principalmente prebetahiperlipidemia (algunas veces hiperlipoproteinemia) .

La hipertrigliceridemia producida por etanol se manifiesta con las siguientes características:



1. La hipertrigliceridemia es usualmente moderada y de duración limitada. Los niveles de triglicéridos raramente exceden los 10000mg/L, y la lipemia tiene su pico a las 12 a 14 horas y desaparece luego de las 25 a 40 horas. Este efecto aparentemente transitorio parece ser cierto, especialmente en las personas normolipémicas.
2. Esta hipertrigliceridemia es, para la mayoría el resultado de un aumento de las VLDL y probablemente de los quilomicrones.
3. El hígado graso asociado con la ingesta de alcohol tiene un rol vital en la formación y extensión de la hiperlipoproteinemia inducida, y los cambios resultantes pueden relacionarse con la etapa del daño hepático.
4. La concentración de triglicéridos en la hiperlipidemia alcohólica está íntimamente relacionada con la calidad y cantidad de los ácidos grasos ingeridos. Es bien conocido que la ingesta simultanea de etanol y grasas (como en una comida compleja o de solo un aceite de maíz) produce una prolongación y aumento en la concentración de triglicéridos.

Sin embargo es obvio que la hiperlipidemia puede ser producida por una excesiva producción y liberación de lípidos (de aquí en adelante lipoproteínas) dentro de la circulación, por una remoción defectuosa o “depuración” de lípidos de la sangre, o por una combinación de estos procesos fisiológicos, el mecanismo preciso de la hiperlipidemia inducida por etanol es aún desconocido.

El protocolo de tratamiento se describe en la sección de hiperlipoproteinemia combinada (p.658).

Hiperlipoproteinemia mixta

Otra forma de hiperquilomicronemia es una hiperlipoproteinemia mixta. Se distingue por la presencia tanto de VLDL como de quilomicrones elevados en el plasma de personas en ayuno con dieta regular. Este desorden puede producirse como un defecto genético primario y puede representar una segunda forma de hiperquilomicronemia familiar. Se observan niveles de triglicéridos similares a los que se ven en la hiperquilomicronemia. Como en estos desórdenes la existencia de síndromes abdominales incluyendo pancreatitis, y los hallazgos físicos de xantomas eruptivos lipemia retinal, y hepatoesplenomegalia, están relacionados al nivel de triglicéridos en plasma. Aunque las características fisiopatológicas de las manifestaciones de esta forma de hiperlipoproteinemia no difiere probablemente de las observadas en la hiperquilomicronemia, una variedad de otras diferencias existen en las observaciones clínicas, genéticas, metabólicas y bioquímicas.

En un marcado contraste con la hiperquilomicronemia, muchas de las instancias en este orden ocurren en la edad adulta. La plena aparición de esta anomalía puede no manifestarse hasta la quinta o sexta década de la vida, presentándose más tarde en las mujeres que en los hombres. Se han descrito varios niños con esta hiperlipoproteinemia familiar.

Triglicéridos extremadamente altos e hiperquilomicronemia no son atribuidos usualmente a desórdenes metabólicos primarios pero se los ha encontrado en varios desórdenes que conducen a enfermedades metabólicas secundarias. Estas enfermedades son propensas a producir estas formas de dislipoproteinemias en pacientes con hiperprebetalipoproteinemia primaria. Por ejemplo, la pancreatitis puede estar asociada con



una pronunciada hiperquilomicronemia, pero posteriormente una discreta hipertrigliceridemia puede encontrarse al reevaluar al paciente en condiciones estables. También es bien conocido que puede presentarse una hiperprebetalipoproteinemia en pacientes diabéticos insulino-dependientes insuficientemente controlados, y en alcohólicos.

Aunque esta forma de hiperlipoproteinemia está asociada con elevados triglicéridos (como VLDL y quilomicrones), el colesterol plasmático puede estar discretamente o moderadamente aumentado, LDL y HDL-colesterol están usualmente normales o bajos. El plasma es usualmente opalescente y puede observarse una capa cremosa flotando encima de un plasma turbio.

Cuando los triglicéridos están por encima de 10000 mg/L, la apreciación visual de un discreto sobrenadante “cremoso” sobre un plasma turbio es dificultoso. El uso de la ultracentrífuga (para remover los quilomicrones) o la prueba de refrigeración (separación de los quilomicrones después de reposarlos una noche a 40C) ultracentrífuga puede ser usada si es necesario para separar los quilomicrones de puede ayudar a diferenciar esta forma de hiperlipoproteinemia. La las VLDL para cuantificarlas individualmente. Una valoración cuantitativa por electroforesis es a veces es suficiente para documentar elevadas VLDL y quilomicrones. Dado que en la práctica puede haber una sobreposición de niveles de VLDL en estos dos patrones lipoprotéicos puede caracterizarse finalmente por una medida de lipoprotein lipasa postheparínica. Esta enzima suele estar presente en este desorden lipoproteico. En ausencia de un ensayo específico para esta enzima una guía razonable y confiable de su presencia puede ser buscada por observación del cambio en los patrones electroforéticos obtenidos de una muestra de plasma de 10 minutos después de una inyección de heparina (10 U/kg por kilo de peso). La relación en plasma de colesterol a triglicéridos en plasma es en esta forma de dislipoproteinemia (0.23 ± -0.02) es usualmente más baja que en la hiperprebetalipoproteinemia (0.86 ± -0.03) porque los quilomicrones incorporan menos colesterol que la VLDL. Las principales dificultades cualitativas pueden ser mayores para la distinción de este desorden lipoproteico de hiperprebetalipoproteinemia (hipertrigliceridemia endógena) porque estos patrones son frecuentemente transitorios, ya que muchos sujetos pierden su banda de quilomicrones con una moderada reducción de triglicéridos.

Esta forma de hiperlipoproteinemia es frecuentemente secundaria a una amplia variedad de enfermedades, drogas, y hábitos dietarios (ver Tabla 33-2). Dado que hay muchos caminos para adquirir esta forma de hiperlipoproteinemia, es necesario una distinción cuidadosa entre causas primarias y secundarias. Una historia de rutina sobre ingesta de etanol y administración de estrógenos o esteroides, un uroanálisis y la medida de ayuno o de una glucosa postprandial de 2 horas, pruebas funcionales de: hígado tiroides y riñón serían útiles para su diferenciación. Acentuado por una diabetes mellitus mal controlada, exceso alcohólico, o estrógenos o contraceptivos orales conteniendo estrógenos en individuos con hiperprebetalipoproteinemia preexistentes, se producen frecuentemente patrones mixtos. Puede presentarse en casos familiares particularmente con triglicéridos por encima de 15000mg/l, lipemia retinal, hepatoesplenomegalia, y xantomas eruptivos.

El defecto bioquímico de esta forma de hiperlipoproteinemia no es aún claro. La presencia de quilomicrones en el plasma de ayuno de un sujeto cuya dieta contiene un contenido bajo de grasas indica claramente que el mecanismo de “depuración” no es el adecuado. El defecto primario está en la remoción de triglicérido plasmáticos que pueden así explicar las elevadas VLDL. Se establece que este defecto no es una simple variante de la

hiperquilomicronemia se establece detectando y cuantificando la heparina liberada del plasma PHLA de estos sujetos. Así diferentes tipos de problemas pueden llevar a esta falla en la remoción de lipoproteínas. Una posibilidad es que la síntesis de triglicéridos endógenos y la secreción resultante de VLDL desde el hígado pueda hacerse a una velocidad anormalmente alta, suficiente para saturar las vías de remoción que son compartidas por los quilomicrones, lo que lleva a la elevación de ambas lipoproteínas. Estudios utilizando lipoproteínas marcadas con radioisótopos han indicado que muchos pacientes con hipertrigliceridemia tienen una elevada síntesis de triglicéridos de VLDL.

La hiperquilomicronemia familiar puede dividirse en hiperquilomicronemia y una forma mixta de hiperlipoproteinemia. Ambos desordenes se manifiestan por niveles muy elevados de triglicéridos, presentando frecuentemente xantomas eruptivos lipemia retinal, hepatoesplenomegalia, y dolores abdominales. La hiperquilomicronemia es causada por una pronunciada deficiencia de lipoprotein-lipasa. La elevación de triglicéridos aparece con la ingestión de grasas dietarias y se manifiestan en niños muy jóvenes. La forma mixta puede ser detectada en raras ocasiones en la niñez, pero es de usual presentación en el adulto. También difiere de la hiperquilomicronemia en que la lipoprotein lipasa es mensurable y son hallazgos frecuentes la intolerancia a la glucosa e hiperuricemia. El único tratamiento efectivo es una dieta baja en grasas. La forma mixta de hiperlipoproteinemia es tratada más efectivamente por una dieta que induce a una pérdida de peso y que frecuentemente responde a alguna de estas drogas: ácido nicotínico, noretindrona, oxandrolona, benzafibrato, gemfibrozil, o clofibrato.

Transformación de Hiperlipidemia en Hiperlipoproteinemia

Limitación de la clasificación en tipos de hiperlipoproteinemia

Son bien conocidas las limitaciones que ofrece la clasificación de los tipos de lipoproteínas de Frederickson, Levy y Lees.^{refs(1196)} Sin embargo se ha remarcado que los patrones lipoprotéicos del plasma no son un sustituto de una clasificación etiológica de hiperlipoproteinemia. La aproximación de Frederickson, Levy y Lees ha sido vista como provisoria hasta un entendimiento más fundamentado de las causas de hiperlipidemia.

Usando solo una medida cuantitativa de colesterol y triglicéridos se pueden clasificar los pacientes en tres grupos mayores: aquellos con solo hipercolesterolemia, los con hipertrigliceridemia sola, y aquellos con una combinación de las dos. Sujetos con hipercolesterolemia pura usualmente tienen un patrón hiperbetalipoproteinémico y aquellos con una hipertrigliceridemia pura sin quilomicrones, un patrón de hiperprebetalipoproteinemia. Sujetos con niveles de colesterol y triglicéridos altos pueden tener perfiles o patrones de disbetalipoproteinemia o hiperprebetalipoproteinemia. Aunque actualmente el tipo de lipoproteínas no es considerado más como necesarias o importantes puede haber cuatro áreas donde el sistema de tipificación mantiene una validez para investigaciones clínica.

1. Los patrones lipoprotéicos son útiles para localizar las diversas anormalidades metabólicas y subrayar las hiperlipidemia.
2. Los tipos de hiperlipoproteinemias así identificados no son estados de enfermedad, pero son el resultado de desórdenes que afectan similarmente las concentraciones en particular de algunas lipoproteínas.
3. Cada tipo de lipoproteína está frecuentemente asociado con algunas



características clínicas distintivas.

4. Cada tipo de lipoproteína, independiente de la causa, se maneja mejor por una dieta específica y la terapéutica propuesta.

El sistema de tipificación tiene cuatro limitaciones mayores:

1. Para la diferenciación de disbetalipoproteinemia, su diagnóstico requiere apoyarse en la determinación de la relación de colesterol en VLDL dividido sobre los triglicéridos plasmáticos como también de la confirmación por electroforesis de la VLDL beta-migrante. Además, en sujetos con una elevación mixta de colesterol y triglicéridos es importante la cuantificación de colesterol-LDL para una correcta diferenciación.
2. La segunda área mayor donde el sistema de tipificación tiene limitaciones es la genética. No se consideran genéticamente, determinados tipos de hiperlipoproteinemia; las determinaciones de lípidos y lipoproteínas no pueden proveer el diagnóstico de un desorden genético específico en un solo paciente, hay evidencias crecientes de una fuerte heterogeneidad en los patrones lipoprotéicos en parientes en primer grado de familias con hiperlipidemia familiar monogénica.
3. La tercera área que este sistema de tipificación no cubre, es la evaluación en la clasificación de la alfa-lipoproteína. Es conocido que la baja concentración de colesterol-HDL es un factor de riesgo independiente para enfermedades coronario cardíacas, y anormalidades genéticas como las hipoalfalipoproteinemia, aunque raras existen.
4. Finalmente el presente sistema electroforético está limitado en su posibilidad para resolver otras fracciones lipoproteicas inusuales tales como variantes lipoproteicas, VLDL beta migrante, e IDL.

De lípidos a lipoproteínas: consideraciones de laboratorio

En la transformación de hiperlipidemia a hiperlipoproteinemia, los análisis de lípidos y la prueba de refrigeración nocturna pueden ser usados para determinar el perfil de lipoproteínas con un justo grado de exactitud. Si el plasma es claro, los triglicéridos probablemente son normales o casi normales (menos de 2000 mg/L). Cuando los triglicéridos aumentan alrededor de 3000 mg/L o más, la apariencia del plasma es usualmente de opalescente a turbio y no es lo suficientemente translúcido como para permitir la lectura clara de un impreso a través del tubo. Cuando los triglicéridos plasmáticos están por encima de 10.000mg/L, el plasma es usualmente opaco o lechoso (lipémico, lactescente). Si los quilomicrones están presentes luego de una incubación nocturna a 40° C se puede observar una capa homogénea cremosa flotando sobre la superficie del plasma. Como está resumido en la Fig. 33-8, un plasma uniformemente opaco usualmente corresponde a hiperprebetalipoproteinemia. Una muestra de plasma opaco con una capa superior cremosa usualmente corresponde a una forma mixta de hiperlipoproteinemia. Una capa fina cremosa de quilomicrones con un plasma infranadante generalmente claro es usualmente consistente con un perfil de hiperquilomicronemia.

En pacientes con hipercolesterolemia sin hipertrigliceridemia, frecuentemente con niveles aumentados de LDL, el plasma es claro pero puede tener un tinte amarillo anaranjado



dado que los carotenos se transportan con las LDL. Luego de una observación visual “simple” se puede efectuar el diagnóstico de anormalidad lipídica en el 90% de los sujetos por cuantificación del colesterol y triglicéridos solamente.

La NECP ATP recomendó protocolos para los análisis de laboratorios para realizar un asesoramiento más eficaz del riesgo de ECV y detectar anormalidades lipoproteicas comunes, incluyendo medidas de colesterol total, triglicéridos, colesterol LDL y HDL. [refs\(1197\)](#) Estas medidas se pueden realizar en la mayoría de los laboratorios (ver abajo). Técnicas analíticas con mayores demandas técnicas, tales como ultracentrifugación analítica o apolipoproteínas y medidas de subfracciones de lipoproteínas pueden ser necesarias para diferenciar lipoproteínas anormales atípicas: estas son usualmente asequibles en laboratorios altamente especializados. Muy comúnmente, niveles de LDL colesterol son convencionalmente medidos por el uso de ultracentrifugación preparativa pero puede ser estimado en forma más barata y conveniente estimándolo por la fórmula de Friedwald:

$$\text{LDL colesterol} = \text{Colesterol total} - \frac{\text{Triglicéridos}}{5} + \text{HDL colesterol}$$

Esta estimación requiere la medida de colesterol HDL por técnicas de precipitación y es exacta en pacientes con triglicéridos menores de 400mg/L con concentraciones por encima de 400mg/L lleva a inconsistencia de los triglicéridos VLDL, es decir, que la relación colesterol /triglicéridos no permite la división por un número fijo, y la fórmula no puede ser usada con mucha exactitud. Además la hipertrigliceridemia es la mayor causa de las medidas inexactas de colesterol HDL. La razón es que la Apo B contenida en las lipoproteínas ricas en triglicéridos son incompletamente precipitadas, resultando un colesterol HDL con resultados falsamente elevados. Métodos nuevos para colesterol HDL (ver Tabla 33-9) son más robustos y pueden tolerar concentraciones de triglicéridos que excedan 15000 mg/L¹⁷ o aún 43000 mg/L (Naïto, resultados no publicados) antes de que ocurran interferencias.

Usar la electroforesis sola, sin una determinación previa de colesterol y triglicéridos no es lógico por las razones siguientes:

1. Excepto en condiciones muy controladas, los patrones electroforéticos son difíciles de cuantificar consistentemente y así proveer concentraciones relativas o absolutas de las clases de lipoproteínas. Muchas de estas dificultades se relacionan a diferentes intensidades de colorante, problemas de aplicación, y otras variables que son difíciles de controlar en electroforesis.
2. La lipoproteína Lp (a) frecuentemente aparece como una banda pre-beta en electroforesis pero no asociada con ninguna elevación de triglicéridos.

Hiperlipoproteinemia secundaria

En general, la cuantificación de lipoproteínas y su tipificación por si sola no pueden distinguir una forma primaria de una secundaria (ver Tabla 33-2). Aún en el diagnóstico de enfermedades concurrentes como parece ser la causa de la hiperlipoproteinemia secundaria no se ha establecido precisamente si esta es la causa de la hiperlipoproteinemia del paciente.



Inversamente acompañando el tratamiento de la causa sospechosa del desorden de la anomalía lipídica, es preciso determinar la naturaleza secundaria de la hiperlipoproteinemia. De ocurrir fallas en esta reversión significaría que la hiperlipoproteinemia puede ser primaria indicando la necesidad de un estudio familiar.

Algunas enfermedades fueron obviamente asociadas con hiperlipoproteinemia desde la historia y examen físico del paciente. Otras requieren estudios de sangre y orina para el diagnóstico. Si en este tamizaje no se revelan anomalías, es razonable asumir que el paciente tiene una hiperlipoproteinemia primaria. La hiperlipoproteinemia se establecerá como familiar en su origen dependiendo de los resultados del estudio familiar.

Otras formas de dislipoproteinemias

En las enfermedades lipoproteicas familiares discutidas en este capítulo, una o más de estas cuatro fracciones (quilomicrones, VLDL, VLDL beta-migrante, y LDL) están presentes en concentración elevada.

Sin embargo hay además otras anomalías lipoproteicas ha ser vistas. Hay tres desórdenes genéticamente determinados en los cuales una o más familias de lipoproteínas están ausentes del plasma o se encuentran en concentraciones extremadamente bajas.^{ref(1198)} El primero que ha sido encontrado es la *abetalipoproteína* en la cual quilomicrones, VLDL y LDL, se pierden. El probable defecto hereditario es el que comprendería la síntesis de la mitad proteica de la LDL, Apo B. Otra enfermedad es la *hipobetalipoproteinemia* (deficiencia familiar LDL), en la cual no se pierde lipoproteínas pero la concentración de LDL está muy por debajo de la normal. En el tercer desorden, la *hipoalfalipoproteinemia familiar* la HDL circula pero contiene cantidades anormales de las dos apolipoproteínas de las HDL. El probable locus afectado por esta rara mutación produce un defecto en la síntesis de Apo-A1. Con esta lipoproteína de alta densidad anormal, pacientes con la *enfermedad de Tangier* tienen baja concentración de HDL, almacenan ésteres de colesterol en muchas partes de organismo y tienen neuropatías por razones no aclaradas. Hay grandes amígdalas anaranjadas que forman parte de este síndrome. Todas estas enfermedades son usualmente detectables inicialmente por una manifestación común de hipocolesterolemia.

Por último aunque no clasificada como dislipoproteinemia, la *hiperalfalipoproteinemia* es una condición en la cual la HDL se encuentra elevada en sangre por encima de las dos desviaciones estándar para una determinada edad y sexo. Esta condición está bajo influencias genéticas, y estas personas parecen tener una vida más larga que aquellas con concentraciones "normales" de HDL. No hay otros síntomas asociados con características de estas lipoproteínas. Se hará más abajo una discusión más detallada sobre estas anomalías lipoproteínas.

Abetalipoproteinemia.

Este raro desorden abetalipoproteinemia tiene cinco características básicas: concentración en plasma no detectable de LDL, mala absorción de grasas, acatocitosis pigmentosa retinal, y enfermedad atáxica neuropática. Esto no es específico de esta condición lipoproteica. La acatocitosis puede presentarse en otras enfermedades en las cuales las lipoproteínas no son deficientes. En la abetalipoproteinemia la LDL está ausente, no meramente deficiente. El colesterol plasmático no excede los 800 mg/L y en general no por encima de 300 mg/l. Esto se acompaña por concentraciones de triglicéridos menores que en



cualquier otra enfermedad, usualmente por debajo de 200 mg/L. La concentración total de fosfolípidos es también baja, es menor de 1000 mg/l. Tanto la distribución de fosfolípidos como la composición de ácidos grasos de los lípidos plasmáticos es anormal y se reflejan frecuentemente con anormalidades similares en los eritrocitos y tejido adiposo. Los problemas gastrointestinales de estos pacientes con abetalipoproteinemia son típicos. La mala absorción de grasa está presente desde el nacimiento, y el periodo neonatal se caracteriza por poco apetito vómitos, pérdida voluminosa de materia fecal, y poco aumento de peso. Las manifestaciones neuromusculares de la abetalipoproteinemia son devastadoras. Las causas de las anormalidades neuromusculares de la abetalipoproteinemia no son claras. La atención se ha dirigido a la cantidad anormal de un pigmento ceroides (Lipofucsina) en este desorden en el cerebelo y otros tejidos.

En la abetalipoproteinemia hay un disturbio funcional del transporte de grasa. Los quilomicrones no entran en el plasma y el transporte neto de glicéridos endógenos en las VLDL parece estar ya sea ausente o llevado a un incambiable mínimo nivel. Una alimentación pesada con carbohidratos durante días produce un aumento brusco de los niveles plasmáticos de glicéridos y en las VLDL en los pacientes con la enfermedad de Tangier y en casi todos los otros sujetos, faltando esto en los pacientes con abetalipoproteinemia. El defecto de la abetalipoproteinemia no es conocido. Lo más probable es una falla en la síntesis de Apo B. El punto de unión intracelular de la lipoproteína conteniendo Apo B es otro posible sitio de disfunción, o puede posiblemente estar ligado al proceso de secreción. Cualesquiera de estos pueden ser primarios, ninguno de estos defectos permiten explicar las muchas manifestaciones secundarias de la enfermedad.

El diagnóstico de la abetalipoproteinemia puede efectuarse en pacientes con una de las anormalidades listadas al comienzo de la sección. Se puede pensar en una disglobulinemia producida por anticuerpos anti LDL. La prueba de laboratorio aislada más importante para el diagnóstico es la determinación del colesterol plasmático. El hallazgo de un valor subnormal, particularmente toda concentración por debajo de 1000 mg/l, debe ser seguida por una determinación de triglicéridos y una electroforesis de lipoproteínas. El diagnóstico definitivo depende de la demostración inmunoquímica de ausencia de LDL y ApoB en el plasma. En todos los pacientes diagnosticados es también importante verificar, y en todos los heterocigotos obligados la concentración de LDL por análisis inmunoquímicos o por ultracentrifugación. En la hipobetalipoproteinemia familiar, los heterocigotas presentan concentraciones de LDL y Apo B más bajas de la normal.

Hipobetalipoproteinemia.

Existe otro trastorno genético aparentemente no relacionado a la abetalipoproteinemia, la hipobetalipoproteinemia, en la cual la concentración de LDL en plasma es aproximadamente una décima parte de la normal. Esta anormalidad lipoproteica se hereda como rasgo autosómico dominante. La concentración plasmática total de colesterol puede ser tan baja como la observada en la abetalipoproteinemia. El porcentaje de colesterol esterificado puede estar en el rango normal. Los niveles de triglicéridos pueden encontrarse dentro del intervalo normal, pero a veces se hallan por debajo del límite inferior. Las concentraciones de fosfolípidos pueden variar entre 100 y 1800mg/l y usualmente se hallan en los límites normales inferiores en la mayoría de los pacientes. La concentración de vitamina A y E son normales o bajas; aunque están reducidas nunca alcanzan los niveles observados en la



abetalipoproteinemia. En la electroforesis es posible observar una tenue banda betalipoproteica. La concentración de HDL, determinada por precipitación, ultracentrifugación preparatoria o ultracentrifugación analítica, es normal; las VLDL habitualmente exhiben una pequeña reducción.

Las LDL se encuentran presentes en el suero cuando se lleva a cabo la prueba de inmunoprecipitación. Estas determinaciones han sugerido la presencia de concentraciones de LDL de 8 a 16 menores que las normales.

Hipoalfalipoproteinemia o analfalipoproteinemia.

La enfermedad de Tangier (deficiencia familiar de HDL) se caracteriza por una severa deficiencia o ausencia de HDL normal en el plasma y por la acumulación de ésteres de colesterol en muchos tejidos del organismo, incluyendo hígado, bazo, nódulos linfáticos, timo, mucosa intestinal, piel y córnea. Existe una combinación de dos manifestaciones que es patognómica: una concentración reducida de colesterol en combinación con niveles normales o elevados de triglicéridos y la presencia de amígdalas y tejido adenoide de coloración anaranjada o amarillenta. Algunos pacientes pueden padecer una neuropatía periférica. La escasa cantidad de HDL difiere cualitativa y cuantitativamente de las HDL normales, en particular en el contenido de apolipoproteína (Apo A-1). Este trastorno parece ser atribuible a un gen autosómico recesivo que afecta la síntesis o catabolismo de las HDL. Los heterocigotos en familias conocidas de heterocigotos usualmente pueden ser identificados por una concentración reducida de HDL (50% por debajo de lo normal), y no exhiben neuropatía ni acumulación de ésteres de colesterol. Entre los estados de deficiencia lipoproteica, la combinación de una concentración muy reducida de colesterol y la elevación de los niveles de triglicéridos confiere a la enfermedad de Tangier una característica única. Algunos pacientes pueden mostrar niveles normales de triglicéridos en el estado de postabsorción y superficialmente pueden asemejarse a aquellos con una deficiencia de LDL. Los niveles plasmáticos de colesterol oscilan entre aproximadamente 400 y 1250 mg/L, dentro de los límites también detectados en la abetalipoproteinemia y la hipobetalipoproteinemia. Las variaciones individuales de los niveles plasmáticos de triglicéridos son considerables y dependen en gran medida de la dieta. La sustitución de hidratos de carbono por grasas a menudo disminuye la concentración plasmática de triglicéridos en este trastorno. El patrón de las lipoproteínas plasmáticas es distintivo: la banda de la alfa-lipoproteína está ausente independientemente del medio de soporte utilizado. La inmunolectroforesis puede generar ocasionalmente una banda débil de precipitación con movilidad de alfa globulina utilizando un suero anti-HDL. Un método sumamente útil para detectar la escasa cantidad de apoproteínas A consiste en la inmunodifusión del plasma con inmunosueros específicos contra la Apo AI y AII. La reactividad con la Apo AII es generalmente mayor que con la Apo AI. La estimación del contenido en colesterol de las lipoproteínas plasmáticas después de la ultracentrifugación preparatoria secuencial o después de la ultracentrifugación y precipitación selectiva con heparina-manganeso confirma la escasez de HDL.

Además de la ausencia o deficiencia de HDL, Las siguientes enfermedades deben ser descartadas:

1. Deficiencia familiar de LCAT. En este caso la HDL está muy reducida, pero los niveles plasmáticos de colesterol son normales o elevados y la mayor parte de colesterol no está esterificado.



2. Enfermedad hepática obstructiva donde los niveles plasmáticos de HDL y de apoproteína A pueden encontrarse reducidos hasta valores similares a los detectados en la enfermedad de Tangier. En esta enfermedad el colesterol sanguíneo no está reducido sino elevado y la mayor parte de colesterol no está esterificado. Las apropiadas pruebas funcionales hepáticas permiten el diagnóstico correcto.
3. Malnutrición severa o enfermedad parenquimatosa hepática, en las que las lipoproteínas de elevada densidad están reducidas. La disminución del colesterol también se asocia con la disminución en los niveles de triglicéridos y LDL.
4. Deficiencia adquirida de HDL atribuible a una disglobulinemia, incluyendo un posible desarrollo de anticuerpos anti-HDL.
5. Otros trastornos del almacenamiento asociados con la presencia de células espumosas y hepatoesplenomegalia. En estas condiciones, los niveles de HDL, son más elevados que los detectados en la enfermedad de Tangier y las anomalías tonsilares están ausentes.

Consecuencias Clínicas de la Hiperlipidemia

¿Cuál es la importancia clínica de la hiperlipidemia y de la hiperlipoproteinemia?. La hiperlipidemia suele ser un estado bioquímico que, si perdura durante un tiempo suficientemente prolongado puede estar asociado con el desarrollo de aterosclerosis y sus complicaciones; incluyendo infarto de miocardio y enfermedades vasculares. En ocasiones la hiperlipidemia puede asociarse con síntomas francos específicos, directamente atribuibles a la presencia de hiperlipidemia. Por ejemplo, la aparición de dolor abdominal pancreatitis, y las manifestaciones cutáneas de la hiperlipidemia, tales como xantomas, arco corneal y xantelasmas.

Enfermedad coronaria. arterial (ECA)

La ECA es casi siempre el resultado de la aterosclerosis con endurecimiento de las arterias. La aterosclerosis es principalmente el resultado de la acumulación de depósitos grasos en las paredes de las arterias coronarias, lo que lleva a la formación de tejido fibroso en la pared del vaso. La ECA es el tipo más frecuente de enfermedad cardíaca y la principal causa de muerte en los Estados Unidos y en muchos otros países. En los Estados Unidos se estima que el 50% de las muertes anuales de adultos se producen por ECA.^{ref(1199)}

La ECA afecta a los hombres de mediana edad; casi el 45% de todos los ataques cardíacos ocurren en individuos menores de 65 años. La enfermedad coronaria cardíaca (ECC) se desarrolla en hombres de 60 años de edad o más jóvenes con una relación de aproximadamente el doble que las mujeres, mientras que las mujeres postmenopáusicas a la misma edad tienen una más alta incidencia de ECC que las premenopáusicas.^{ref(1200)} Tanto para hombres como para mujeres, la incidencia de enfermedad coronaria vascular (ECV) y la tasa de mortalidad por aterosclerosis aumenta con el avance de la edad. Alrededor del 75% de la mortalidad relacionadas a las coronarias son el resultado de la aterosclerosis. Cada año alrededor de 1.25 millones de Americanos se afectan con infarto de miocardio (MI), y se realizan alrededor de 300,000 operaciones de bypass.^{ref(1201)} Se estima que el costo anual de

1370

ECC para la población americana es aproximadamente entre U\$42 billones a U\$ 88 billones, [ref\(1202\)](#)

Factores de riesgo asociados con enfermedad arterial coronaria.

Aunque la causa básica de la EAC es desconocida; los científicos han logrado identificar una serie de factores asociados con un claro incremento de las probabilidades de desarrollar un ataque cardíaco en etapas posteriores de la vida. [refs\(1203\)](#) Estos factores, que se pueden correlacionar con la presencia de EAC, han sido denominados *factores de riesgo*. En el recuadro se enumera los riesgos primarios y secundarios asociados con enfermedad coronario arterial. Algunos factores de riesgos, son inevitables, como la susceptibilidad racial o genética, mayor prevalencia en hombres, y las probabilidades de sufrir un ataque cardíaco a medida que se envejece. Muchos de los factores de riesgo son, sin embargo susceptibles de modificación. Entre ellos son particularmente importantes la hipertensión, el tabaquismo y el colesterol elevado. Aproximadamente un 50% de los individuos que sufren un ataque cardíaco, son personas que tienen uno o más de estos tres factores. De acuerdo a los datos de Framingham, hay un claro gradiente de tasa de incidencia en relación con la concentración de HDL-colesterol sérico. Personas con niveles por debajo de 350 mg/L muestran una tasa de enfermedad coronaria equivalente a ocho veces que la correspondiente a personas con HDL-colesterol por encima de 650 mg/L.

Un importante factor de riesgo adicional incluye a la lipoproteína (a) (Lpa), oxidación de LDL, partículas lipoproteicas de tamaño pequeño (o LDL densas), fibrinógeno, homocisteína, isoformas de apolipoproteínas específicas (Apo) A-I, B, E, y triglicéridos y remanentes de lipoproteínas ricas en triglicéridos. [refs\(1204\)](#) El grado de riesgo aún no ha sido asignado a estos, factores. Otros posibles factores cuya importancia se está aun estableciendo incluyen hipertrigliceridemia, niveles de actividad física y tipos de personalidad.

Formación de Placas Ateroescleróticas

La arquitectura de los vasos sanguíneos (arterias) sanos consiste en una *íntima*, recubierta interiormente por el endotelio, constituyendo la luz del vaso, la cual está unida por la lámina elástica interna a la *media* (Fig. 33-9). La capa más externa es la adventicia, que esta unida a la lámina externa elástica y al exterior del mismo vaso. La intima es el sitio en el que se forma la lesión aterosclerótica. El endotelio sirve como una barrera para los materiales que lleva la sangre y es el sitio donde al menos dos mitógenos se sintetizan y secretan (ver más adelante). La túnica media es la pared muscular de la arteria que consiste en células musculares lisas retenidas juntas por una membrana basal discontinua y por intercalado de fibras de colágeno y proteoglicanos. [refs\(1205\)](#) Las células del músculo liso que proliferan en la íntima arterial para formar las lesiones avanzadas de aterosclerosis se originan en la media. Esta proliferación de la célula del músculo liso representa el *sine qua non* de las lesiones de aterosclerosis avanzada. Las células del músculo liso, como el endotelio y los fibroblastos, contienen receptores para LDL y PDGF (ver bajo). Un aspecto característico de las células del músculo liso que se encuentran en las lesiones de aterosclerosis es la acumulación de lípidos que resulta en la formación de células altamente vacuolizadas o *células espumosas*.

Hay tres etapas progresivas en la formación de la placa ateroscleróticas: (1) las *estrías lipídicas*, las que gradualmente desarrollan en lesiones sobresalidas, que son llamadas *placas*

grasas; (2) la *placa fibrosa*, que tiene una proliferación de células de músculo liso con un casquete fibroso rico en colágeno que cubre al núcleo lipídico que está limitado por las células espumosas y rodea una acumulación amorfa extracelular de ésteres de colesterol; y (3) la *lesión complicada*, que puede mostrar calcificación, hemorragia, ulceración (ruptura), y trombosis (Fig.33-10). Es la lesión complicada que frecuentemente subyace el evento clínico agudo de oclusión arterial que conduce al daño de miocardio (MI).

La formación y acumulación de células espumosas en la íntima es el sello de calidad de la lesión ateroscleróticas temprana. Actualmente se cree que la mayoría de las células espumosas son derivadas desde los macrófagos enviados desde la sangre aunque algunas pueden venir desde las células del músculo liso. Un paso fundamental en el desarrollo de las células espumosas es la captación acelerada de LDL modificada (ver mas adelante bajo), seguido por proliferación de células de músculo liso (con y sin depósitos de lípidos en sus citoplasmas) (Fig. 33-11). La proliferación de la célula del músculo liso está acompañada por una síntesis aumentada de elastina celular, colágeno, y proteoglicanos, que estas células depositan extracelularmente en el desarrollo de la placa.

El desarrollo de la lesión ateroscleróticas es promovido por la secreción de dos células sanguíneas claves, macrófagos y plaquetas. Los macrófagos pueden secretar agentes quimiotácticos (como interleiquina-1, anión superóxido, leucotrieno B₄) y factores de crecimiento (como factor de crecimiento derivado plaquetario (conocido más ampliamente por su acrónimo en inglés, PDGF), interleiquina-1, factor de crecimiento fibroblasto, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento transformante-β). Estos dos grupos de factores derivados de los macrófagos son probablemente responsables de la promoción de la proliferación de tejido conectivo en los vasos sanguíneos durante el proceso de enfermedad.[ref\(1206\)](#)

Las plaquetas juegan un rol pequeño en algunas lesiones ateroscleróticas, sin embargo juegan un rol principal en la formación del trombo. Esto es usualmente un mural o trombo oclusivo que conduce a un MI. Las plaquetas puede también producir los mismos factores de crecimiento como macrófagos activados. Así, en los sitios de daño en los que ocurre la exposición de colágeno, estimulando y proliferando las respuestas numerosos vasoactivos, pueden tomar lugar y probablemente jueguen un rol en la iniciación de las lesiones ateroscleróticas.

La etapa bioquímica inicial en la proliferación celular, es la infiltración de lipoproteínas (VLDL remanentes, LDL, y IDL) en el espacio subendotelial. Aquí algunas lipoproteínas son atrapadas en la sustancia conectiva íntima, modificadas, e ingeridas por los macrófagos para formar células espumosas. La toma de LDL por los macrófagos puede ser incrementada si la LDL es modificada por oxidación o degradación de Apo B por radicales oxígeno reactivo (como radicales libres), o por modificación de la Apo B por glucosilación o por reacción con malonaldehído.[ref\(1207\)](#) (Fig. 33-12)

Los macrófagos cargados de grasa, junto con un variado número de células del músculo liso cargadas de lípidos, son las que desarrollan las vetas grasas. La mayoría de los lípidos en las células espumosas son colesterol libre y ésteres de colesterol.

Las estrías lipídicas son observadas tempranamente en la niñez, y sus transformaciones en las lesiones complicadas usualmente ocurren entre la cuarta y quinta década antes de la manifestación clínica de la enfermedad sean evidentes, incluyendo angina pectoris, MI o



muerte cardíaca súbita.[ref\(1208\)](#) En hombres, el primer evento MI usualmente ocurre alrededor de los 55 años, mientras que en mujeres hay 10 años de demora, ocurriendo alrededor de los 65 años. Este proceso aterosclerótico puede ser acelerado por tener (1) factores de riesgo adicional ECC (ver mas adelante), (2) daño endotelial, que remueve la barrera natural a la entrada de lipoproteínas en la pared arterial o causa trombosis, y (3) una predisposición genética para hipercolesterolemia primaria.

Etiología de las lesiones ateroscleróticas

Los conceptos actuales sobre las patogénesis de las lesiones ateroscleróticas incluyen: la respuesta al daño y la hipótesis monoclonal. La primer teoría se centra en la premisa que ocurre un daño inicial a la célula endotelial alineada a la pared arterial. El daño endotelial, causado por factores mecánicos, químicos, inmunológicos, tóxicos, o infecciosos, resulta en un aumento de la toma de LDL colesterol. Esto, a la vez, cambia las características de superficie de las células endoteliales y la circulación de leucocitos (monocitos y plaquetas), conduciendo a favorecer la adhesión de monocitos al endotelio.[ref\(1209\)](#) Los monocitos son entonces transformados en macrófagos, que ahora tienen la habilidad de tomar lípidos adicionales. De acuerdo con Steinberg et al.,[ref\(1210\)](#) la oxidación del LDL puede jugar un rol central en la aterogénesis en por lo menos cuatro caminos (Fig. 33-13): (1) actúa como un quimiotáctico para los monocitos circulantes en la sangre para entrar al espacio subendotelial; (2) causa la transformación de los monocitos en macrófagos; (3) atrapa los macrófagos en los espacios endoteliales por inhibición de su motilidad; y (4) es tóxico para las células endoteliales. El macrófago cargado de lípido forma la célula espumosa que contribuye al desarrollo de la estría lipídica. También, estos macrófagos activados pueden formar por lo menos cuatro factores de crecimiento diferentes, los que pueden ser responsables de la migración de las células del músculo liso y fibroblastos dentro de la íntima y para su subsiguiente proliferación. En esta hipótesis las plaquetas por agregación están involucradas en la aterosclerosis formando trombos murales en particular en sitios anatómicos donde el flujo sanguíneo por efectos de rozamiento puede causar cierto injuria sobre el endotelio. Este mecanismo produce una liberación de factores de crecimiento (similares a los que se liberan por activación de macrófagos) lo que puede llevar a la proliferación de lesiones ateroscleróticas del músculo liso.

También se debe mencionar que otros factores hemostáticos se han sido estudiados y han mostrado tener una razonable asociación con la enfermedad cardiaca isquémica (ECI).[ref\(1211\)](#) Estos factores incluyen fibrinógeno, factor VII, factores VIII, antitrombina III, plasminógeno activador inhibidor I, Lp(a), y anticuerpos antifosfolípidos. De estos diversos factores trombogénicos, el más convincente como factor de riesgo independiente para ECV ha sido el fibrinógeno plasmático. El estudio Northwick Park Heart[ref\(1212\)](#) señala que la incidencia de ECI está mas fuertemente relacionada a los niveles de fibrinógeno que al de la concentración de colesterol total. El estudio de Leigh[ref\(1213\)](#) también concluye que la asociación entre la concentración de fibrinógeno y ECI es mas alta que la de colesterol total, la presión sanguínea y el tabaquismo. Los posibles mecanismos del rol del fibrinógeno como factor de riesgo trombogénico incluye su función como precursor de la fibrina y la consecuente trombosis y su efecto sobre la viscosidad sanguínea, el cual afecta el flujo hemodinámico, característica que lleva a la trombosis.

La segunda hipótesis asociada con la aterogénesis es la hipótesis monoclonal. Esta

premisa está basada en una sola célula muscular lisa que sirve como fuente de todas las células dentro de la lesión. El neoplasma benigno de la pared arterial se deriva de una célula la que ha sido transformada por virus, sustancias químicas, toxinas u otros mutágenos.

El Programa Nacional de Educación para el Colesterol

Al final de la década de los 80, los profesionales de la salud descubrieron que era necesario un esfuerzo unificado para estandarizar las propuestas para la detección y clasificación de individuos con alto riesgo de CDH y para estandarizar los tratamientos y el monitoreo de dichos individuos. Este esfuerzo requería también una mayor fuerza educacional para informar a los médicos generales y a sus pacientes con factores de riesgo de CDH. Para alcanzar esta meta científica y educacional, el gobierno federal y un gran espectro de grupos de profesionales de la salud trabajaron juntos para establecer lineamientos y recomendaciones con la intención de reducir CDH en América. Esta campaña nacional fue denominada Programa Nacional de Educación para el Colesterol (NCEP).

Como resultado de este esfuerzo, el NIH en 1985^{ref(1214)} y en 1988 (El Panel de Tratamiento de Adultos de NIH [ATP] de la NCEP) recomendó nuevos niveles de decisión médica para el colesterol y colesterol LDL que debería tener un mayor efecto en la reducción de la morbilidad de ECC y la mortalidad en los Estados Unidos, donde el ECC es todavía una enfermedad principal. Para simplificar el sistema de clasificación y para hacer más conveniente de recordar los niveles de corte, el panel eliminó la estratificación por edad y sexo antes recomendado.^{ref(1215)} Estos nuevos niveles de corte, mostrados en la Tabla 33-4, se aplican a todos los adultos de 20 años o mayores.^{refs(1216)}

El objetivo del programa de NCEP era establecer un criterio que definiese la persona con alto riesgo para intervención médica y para proporcionar claros lineamientos en la forma de cómo detectar, determinar objetivos, tratar, y monitorear estos pacientes en el tiempo. Algunos de los aspectos fundamentales de este reporte^{ref(1217)} guía sobre colesterol son los siguientes:

- Todos los adultos de 20 años o más deben ser monitoreados para *hipercolesterolemia* midiendo su *nivel de colesterol sanguíneo*.
- Luego que un incremento de colesterol total es confirmado a partir de medidas repetidas, el *colesterol LDL* y *HDL* deben ser determinados.
- Son definidos nuevos límites superiores más agresivos de colesterol total y LDL para una estrategia *medicinal preventiva primaria* (Tabla 33-4).
- El *colesterol LDL* y no el colesterol total servirá como el índice principal para *clasificar el riesgo de ECC* en una persona.
- Junto con las pruebas de lípidos y lipoproteínas, todos los adultos deberían también ser evaluados para la presencia de *otros factores de riesgo para ECC* (fumar, diabetes mellitus, obesidad severa, o una historia de ECC en el paciente, o un ECC prematuro en miembros familiares, o enfermedad cerebrovascular definitiva o vascular periférica oclusiva). El paciente es considerado que tiene un *estado de alto riesgo* si el o ella tiene (1) ECC definitivo (eso es, infarto de miocardio primario o isquemia miocárdica), o (2) la presencia de dos o más factores de riesgo de ECC, o (3) una anomalía en

lípidos o lipoproteínas con la presencia de otro factor de riesgo de ECC.

- La selección de modalidades de intervención terapéutica (eso es, dieta con agentes para disminuir el colesterol), objetivos de tratamiento, y métodos de monitoreo han sido claramente señalados.

Un reporte posterior^{ref(1218)} fue publicado con modificaciones para los lineamientos recomendados. En pocas palabras se agregó lo siguiente:

- Incrementado énfasis del estado de riesgo de ECC como una guía para el tipo y la intensidad de una terapia de reducción de colesterol. Especial énfasis se le ha dado al paciente con ECC y otras enfermedades ateroscleróticas, lo que se consideró el riesgo mas alto y se establecieron valores blanco de LDL más bajos.
- La *edad* (45 años o más para hombres y 55 años o más para mujeres) fue agregada a la lista principal de factores de riesgo de ECC (Tabla 33-5).
- Retardar el uso de agentes farmacológicos para la terapia de lípidos y lipoproteínas en la mayoría de hombres jóvenes adultos y mujeres premenopáusicas con elevados niveles de colesterol LDL.
- Acrecentar el reconocimiento de mujeres postmenopáusicas de alto riesgo y pacientes ancianos de alto riesgo que están en buen estado de salud y que son candidatos para la terapia de reducción de colesterol.
- Más atención al *colesterol HDL* como un factor de riesgo de ECC, que incluye su medición en las determinaciones de colesterol inicial. Un alto nivel de colesterol HDL (mas de 600 mg/L) ha sido designado como un factor negativo de riesgo de ECC, mientras que un bajo colesterol HDL (menos de 350 mg/L) ha sido designado como un factor positivo de riesgo de ECC (Tabla 33-6). Además, cuando estamos seleccionando una droga para la reducción de colesterol LDL, se debe considerar el efecto de la droga en el colesterol HDL del paciente.
- Se incrementa el énfasis en la *actividad física y pérdida de peso* como componentes de la terapia dietaria de alto colesterol sanguíneo.

Debe ser enfatizado que la estrategia de NCEP ATP está basada en *colesterol LDL* y *colesterol HDL* siendo estos los criterios iniciales usados para la clasificación de pacientes con riesgo de ECC, dependiendo también de otros factores (Tabla 33-5) que pueden influenciar en la categorización final de riesgo.

El panel NIH experto en niveles de colesterol sanguíneo en Niños y Adolescentes^{ref(1219)} recomendó lo siguiente (ver Tabla 33-7):

- “Tamizaje” selectivo de *niños de alto riesgo y adolescentes* que tienen una *historia familiar de enfermedades cardiovasculares prematuras* o por lo menos un padre con alto colesterol sanguíneo (mas de 2400 mg/L). La selección es también aplicada si los *padres o abuelos*, a los 55 años de edad o menos atravesaron diagnósticos de arteriografía coronaria y se les detectó aterosclerosis. Esto incluye padres y abuelos que han sufrido angioplastia o cirugía bypass de arterias coronarias. Esto también incluye padres o abuelos que sufrieron una MI documentado, una angina pectoris, una enfermedad vascular periférica, una enfermedad cerebro vascular o una muerte cardíaca súbita.

- No fue defendida el *tamizaje universal* de niños y adolescentes para alto colesterol en sangre.
- Los objetivos mínimos para el *tratamiento* de pacientes con una valor límite de colesterol LDL es disminuir dicho nivel a menos de 1100 mg/L y para el paciente con alto colesterol LDL es disminuir el nivel a menos de 1300 mg/L. La terapia con drogas no debe ser usada en niños menores de 10 años de edad y para aquellos a los cuales no se les ha sometido a una adecuada dieta para bajar el colesterol de por lo menos 6 meses a 1 año.

Los factores de riesgo positivos o negativos de ECC son usados como una guía para el tipo e intensidad de terapia que debe ser usado por el médico general para disminuir el colesterol (Tabla 33-5). Por ejemplo un hombre mayor de 45 años o una mujer mayor de 55 años está en mayor riesgo de ECC y debería ser tratado mas agresivamente. Por lo tanto los objetivos para disminuir los niveles séricos de colesterol de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y colesterol total son más intensivos.

Debe remarcarse que una persona con dos o más factores positivos de riesgo señalados en la Tabla 33-5 adicionado al valor de colesterol LDL debería ser clasificado como un individuo de alto riesgo para ECC. Debe tenerse en cuenta que un valor alto de colesterol HDL (mayor de 600 mg/L) representa un factor de riesgo de carácter negativo.

Las estrategias de tratamiento todavía se concentran en disminuir el alto nivel de colesterol LDL sanguíneo para proporcionar una prevención primaria de ECC. EL algoritmo de la modalidad de pruebas y tratamiento para la prevención primaria en adultos *sin* evidencia de ECC se muestra en las Figs. 33-14 y 33-15. Por ejemplo, para una persona con una cantidad de colesterol total deseable (≤ 2000 mg/L) el valor de colesterol HDL determina la estrategia a seguir. Si el colesterol HDL está en los ≤ 350 mg/L, se debe analizar el LDL. En la mayoría de los casos el reciente ejemplo no daría una gran preocupación clínica a menos que el colesterol HDL estuviera considerablemente disminuido (< 100 mg/L), el cual podría ser la causa de la concentración anormal de colesterol LDL. A aquellos con colesterol HDL ≤ 350 mg/L se les debería suministrar materiales de educación general sobre modificación dietaria, ejercicio físico, y otras actividades de reducción de riesgo de ECC y controlar los niveles de colesterol total y HDL en 5 años. Para individuos en la línea límite del grupo de alto riesgo (colesterol total entre 2000 y 2390 mg/L), la concentración de colesterol HDL y la presencia o ausencia de múltiples factores de riesgo de ECC (ver Tabla 33-7) determinan la estrategia a seguir. Por ejemplo, aquellas personas con concentraciones de colesterol HDL ≤ 350 mg/L con menos de dos factores de riesgo se les debe suministrar material educacional como lo mencionado anteriormente y deben monitorear su nivel de colesterol total y HDL en uno o dos años. Por otra parte, a los individuos con colesterol total de 2000 a 2390 mg/L y con HDL colesterol ≤ 350 mg/L o dos o más factores de riesgo de ECC se les debe realizar analizar las lipoproteínas. Como los individuos con colesterol total de 2400 mg/L o más son considerados de alto riesgo, se les debe realizar análisis de lipoproteínas antes que las decisiones clínicas sean hechas. Otra vez, debe enfatizarse que es el colesterol LDL y no el colesterol total es el que afecta más fuertemente al riesgo de ECC de la persona. Personas con colesterol LDL menor a 1300 mg/L no necesitan evaluación posterior o intervención médica activa; se les debe otorgar información general como la mencionada anteriormente y deben ser reevaluados en 5 años. Personas con concentraciones

colesterol LDL en el límite de alto riesgo (1300 a 1590 mg/L) que tienen menos de dos factores de riesgo de ECC se les debe dar instrucción general y deben ser reevaluados en 1 año. Pacientes con colesterol LDL de alto riesgo (>1600 mg/L) y aquellos con límite de alto riesgo que tienen dos o más factores de riesgo deben ser evaluados clínicamente y deben comenzar una terapia activa para disminuir el colesterol.

Para una prevención secundaria de la enfermedad en adultos con evidencia de ECC o con otra enfermedad clínica aterosclerótica, se analizan las lipoproteínas, y se determina la concentración de colesterol LDL es el índice clave para la clasificación de terapia y riesgo de ECC. Para una prevención secundaria la concentración óptima de colesterol LDL es < 1000 mg/L, un objetivo más agresivo que el de la prevención primaria. Las personas en esta categoría con niveles de colesterol LDL > 1000 mg/L deben tener un seguimiento clínico apropiado y deben comenzar una terapia de disminución de colesterol.

Para alcanzar estos objetivos de colesterol LDL descritos en las Tablas 33-4, 33-6 y 33-7, se remarca que la terapia debe siempre comenzar con una intervención dietaria. La pérdida de peso (si corresponde) y actividad física deben ser parte del proceso de intervención. Si persisten elevados los niveles de colesterol LDL luego de la dieta apropiada, se debe considerar la intervención con drogas. El reporte de NCEP es muy específico a cuando se debe aplicar la terapia con drogas (Tabla 33-8). Además, el reporte recomienda retardar el uso de drogas en la mayoría de hombres jóvenes adultos (menores de 35 años de edad) y en mujeres premenopáusicas con concentraciones de colesterol LDL por debajo de 2200 mg/L las cuales no están de otra manera en riesgo.

Un error común en la clasificación del riesgo de ECC en un paciente es la no diferenciación de las dislipidemias primarias de las secundarias. Algunas de las más frecuentes dislipidemias secundarias se encuentran en la Tabla 33-2. Es imperativo que se trate primero la condición que lleva a la hiperlipidemia secundaria.

Métodos de Análisis

Colesterol

Hebert K. Naito

Principios de análisis y uso corriente

Diversas críticas que describen la utilidad y limitaciones de diferentes métodos de colesterol se encuentran disponibles.^{refs(1220)} En la rutina de laboratorio practicada hoy, sin embargo la determinación de colesterol por medio de ensayos enzimáticos son virtualmente los únicos métodos empleados.

El método de análisis de colesterol más antiguo todavía en uso es el de Liebermann-Burchard (L-B)^{ref(1221)} (Tabla 33-9, método 1). Un intenso color verde azulado es producido como resultado de la reacción entre anhídrido acético y ácido sulfúrico, con una solución de colesterol en cloroformo. Esta reacción se transformó en la base para subsecuentes métodos para la medición de colesterol. La reacción química responsable del cambio de color en los métodos colorimétricos es la oxidación progresiva del colesterol. Las modificaciones al procedimiento L-B permitieron la medición de colesterol libre, éster de colesterol, o ambos. La medición de estas diferentes fracciones puede ser realizada por medio



de una saponificación (hidrólisis de una unión éster) con el uso de un compuesto de saponina, tal como digitonina. La digitonina reacciona con el colesterol no esterificado y forma un precipitado. La medición del colesterol remanente en el sobrenadante proporciona una estimación del colesterol esterificado. Se calcula el colesterol libre sustrayendo el valor de colesterol esterificado del colesterol total, que es medido directamente, sin el uso de la digitonina.

El método L-B tiene muchas desventajas que pueden afectar los resultados adversamente. Por ejemplo la intensidad de color producida por el colesterol esterificado es mucho mayor que el producido por el colesterol no esterificado, o colesterol libre. Por lo tanto es necesario el paso de saponificación para asegurar que las concentraciones de colesterol total no son sobrestimadas por la predisposición positiva causada por la presencia de ésteres de colesterol. Un aumento en la medida de colesterol puede ocurrir en presencia de: concentraciones de bilirrubina,^{ref(1222)} y Vitamina A aumentadas (retinol), y digitonina sin reaccionar. Además, la precisión del método L-B es fuertemente dependiente de la estricto cumplimiento de los tiempos y temperaturas de reacción, y la longitud de onda usada para medir el cambio de color final. Pequeñas variaciones en estos parámetros pueden producir resultados erróneos.

El método de referencia para colesterol, utilizado por el centro para el control y la prevención de enfermedades, está basado en la modificación del procedimiento de Abell et al^{ref(1223)} (Tabla 33-9, método 2) que, en cambio, es una modificación de la reacción L-B. Este método de referencia involucra la hidrólisis inicial de ésteres de colesterol. El colesterol libre es luego extraído en éter de petróleo, y el desarrollo de color es realizado con el uso de un reactivo formado por ácido acético-anhídrido acético y ácido sulfúrico.

Los métodos más comunes en uso para la determinación de colesterol en suero, plasma, o sangre total son los procedimientos enzimáticos (Tabla 33-9, método 3). El primer paso en la secuencia enzimática usa la enzima *colesterol esterasa* para hidrolizar ésteres de colesterol a colesterol libre. El colesterol libre producido, junto al colesterol libre que estaba presente en la muestra inicialmente, es luego oxidado a colest-4-en-3-ona y H_2O_2 en una reacción catalizada por *colesterol oxidasa*. El paso final de este ensayo hace uso de la habilidad del H_2O_2 para oxidar varios compuestos y producir un producto coloreado, siendo la magnitud del color producido proporcional a las concentraciones de colesterol en la muestra. Muchas reacciones indicadoras de peróxido de hidrógeno que han sido aplicadas, incluidas las de Trinder, están basadas en la formación de un quinonimina coloreada (máximo de absorción, 500nm; Tabla 33-9, método 3a). Una desventaja de esta reacción indicadora es la interferencia ejercida por la bilirrubina.^{ref(1224)} Además, las muestras turbias pueden interferir con las lecturas de absorción y se debe evitar el uso de tubos Tygon pues la quinonimina es absorbida por dicho tubo. También se han desarrollado las reacciones indicadoras espectrofotométricas de ultravioleta, basadas en la formación de NADPH, (Tabla 33-9, método 3b). Otras técnicas que han sido aplicadas para el monitoreo de formación de H_2O_2 producido por la colesterol oxidasa incluye la oxidación de ácido homovainillílico por parte de H_2O_2 formando un compuesto fluorescente monitoreado a 470 nm; 40 y el uso de técnica polarográfica para el monitoreo directo de la producción de H_2O_2 .^{ref(1225)}

El Panel de Estandarización de Laboratorio (LSP) recomendó los siguientes lineamientos para medidas confiables de colesterol:^{ref(1226)}



- Los *objetivos de precisión intralaboratorio* deben ser \pm CV del 3% (coeficiente de variación) o menores y la *predisposición analítica* (exactitud) debe ser 3% o menos de los valores del método de referencia.
- La *exactitud* de cada sistema analítico debe ser verificado por el uso de *materiales de referencia* certificados por el Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST, Gaithersburg, Md.), El Centro para Control y Prevención de Enfermedad (CDC, Atlanta, Ga.), o el Colegio de Patólogos Americanos (CAP, Chicago, Ill.) u otro material de referencia que sea atribuible al del Comité Nacional para Sistemas de Referencia Nacionales de Estándares de Laboratorio Clínico para Colesterol (NCCLS, Villanova, Penna; NRS/ Chol).
- Todos los laboratorios deben participar en un programa de aptitud de pruebas (PT) que provee valores de referencia para colesterol que son atribuibles a los de NCCLS NRS/Chol. Los programas PT deben tener como objetivo un *error total* de 9.5% o menor (para medidas únicas) para evaluar la pericia de los participantes (precisión y exactitud) en medidas de colesterol.
- Las decisiones médicas deben estar basadas en por lo menos dos análisis separados, en dos ocasiones separadas, para las medidas de colesterol total y LDL. Los valores de colesterol total deben estar dentro de 300 mg/L antes que sean promediados para fijarlo como un nivel de colesterol usual individual.
- Se debe estandarizar la preparación del paciente y los procedimientos de recolección de sangre para minimizar los factores preanalíticos que pueden conducir a valores de colesterol inexactos.

Especimen

Suero, plasma o sangre total son especímenes apropiados para las determinaciones de colesterol. Si se usa plasma o sangre total, el anticoagulante preferido es EDTA (1mg/mL) o heparina. Anticoagulantes como fluoruro, citrato, y oxalato pueden producir errores de dilución como resultado de su efecto osmótico de salida de agua desde los eritrocitos al plasma. Los valores de colesterol plasmáticos son entre 3% y 5% menores que los valores en suero. [ref\(1227\)](#) Se debe recordar que los valores de riesgo de colesterol para enfermedad cardíaca coronaria NECP (ver Tabla 33-4) están basados en suero. Si se usa plasma para el análisis, los valores deben multiplicarse por 1.03 para dar los valores equivalentes de suero. [ref\(1228\)](#)

Las muestras para la determinación de colesterol no necesitan ser tomadas de individuos en ayunas. Sin embargo, si las concentraciones de triglicéridos o HDL colesterol van a ser medidas en la misma muestra, la sangre debe colectarse solamente si el paciente tiene un ayuno mínimo de 12 horas. Una vez recolectado, el suero y el plasma deben separarse de los glóbulos rojos lo mas pronto posible. El intercambio de colesterol entre la membrana de glóbulos rojos y el suero o plasma puede alterar las concentraciones de colesterol. Si el análisis ha de ser demorado por varios días, las muestras pueden ser guardadas a 4° C. Para períodos más largos de almacenamiento, el congelado de las muestras a -60° C permite resultados reproducibles hasta un período de un año. [ref\(1229\)](#) Las muestras congeladas a -20° C pueden ser mantenidas por varios meses. Las muestras que han sido mantenidas a temperaturas de congelación deben mezclarse adecuadamente antes del análisis; para revertir



la separación de varias fracciones de lípidos de acuerdo a sus densidades dentro del espécimen, lo que puede ocurrir con el almacenamiento en un lapso de tiempo.

Intervalos de Referencia.

Los intervalos de referencia para las concentraciones de colesterol total se basan en un riesgo relativo de desarrollar ECC (ver Tabla 33-4 y 33-7). En la Tabla 33-5 se dan los factores de riesgo positivos y negativos que han sido asociados con el desarrollo de ECC y por lo tanto son parte del esquema de clasificación de riesgo. Las decisiones de diagnóstico y tratamiento (ver Figs. 33-14 y 33-15) están también basadas en la concentración de HDL (ver Tabla 33-6) y LDL (ver Tabla 33-4 y 33-7).

Lipoproteína de alta densidad (HDL) colesterol

Hebert K. Naito

Principios de análisis y usos corrientes.

Las concentraciones de lipoproteína de alta densidad (HDL) en suero son consideradas uno de los factores de riesgo primarios para enfermedades coronarias.^{ref(1230)} Recientes lineamientos indican que este compuesto debe ser incluido junto con la medición del colesterol total como parte del proceso inicial de testeo de riesgo de enfermedades coronarias. Se debe realizar la medición de HDL como parte de una rutina luego de una intervención farmacológica de hipercolesterolemia. Los objetivos intralaboratorio para la precisión son de un porcentaje de coeficiente de variación (CV%) de $\leq 4\%$, y los objetivos de exactitud es alcanzar un sesgo de un 10% desde los valores de referencia.

Aunque ha sido usada una variedad de técnicas han sido usadas para medir concentraciones de HDL, podemos realizar las determinaciones de HDL en un laboratorio clínico de rutina, usando simple métodos de precipitación. Aunque estas técnicas de precipitación son rápidas y fáciles de realizar, pueden dar resultados altamente dispares cuando son realizadas en diferentes laboratorios. Las diferencias interlaboratorios para la determinación de HDL son altas, con coeficientes de variación que oscilan entre 7% y 25%.

El método de referencia para las determinaciones de HDL emplea ultracentrifugación (Tabla 33-10, método 1). Con esta técnica, la muestra a ser analizada es ajustada a la densidad de 1.063 g/mL intercalando el espécimen con una solución de bromuro de potasio. La muestra es luego centrifugada a 105,000g por 24 horas a 16 ° C. Como la densidad del HDL es mayor a 1.063 mientras que las lipoproteínas de baja (LDL) y muy baja densidad (VLDL) son menores a 1.063, las fracciones de LDL y VLDL irán a la fracción sobrenadante, mientras que el HDL y un pequeño porcentaje de lipoproteínas con densidades mayores a 1.063 irán a la solución infranadante. La presencia de estas pequeñas cantidades de lipoproteínas con densidades mayores a 1.063 encontradas en el infranadante es comúnmente ignorada. El sobrenadante conteniendo fracciones de LDL y VLDL es removida por medio de aspiración, y se mide el HDL colesterol en la solución inferior. Un enfoque alternativo es empleado por el Centro de Control y Prevención de Enfermedades en Atlanta, Georgia, laboratorio de estandarización de lípidos. Este procedimiento vincula la remoción del VLDL por ultracentrifugación y entonces la fracción de LDL es precipitada por el uso de una solución de heparina-cloruro magnesio (ver bajo más adelante). La concentración de HDL es



determinada por medidas del contenido de colesterol remanente en la solución.

Los métodos más comunes en uso para determinación de HDL colesterol involucran la precipitación selectiva de lipoproteínas conteniendo Apo-B con solución de polianiones (Tabla 33-10, método 2 y Fig. 33-16). Las soluciones de polianiones mas frecuentemente usadas para este propósito incluyen fosfotungsteno de sodio y cloruro de dextrano sulfato-magnesio. Estos agentes unen y precipitan todas las fracciones principales de lipoproteínas excepto el HDL. El uso de heparina-cloruro de magnesio como agente precipitante es infrecuentemente empleado, aunque es considerado un agente precipitante de opción. El uso rutinario de heparina cloruro de magnesio es limitado a dos factores principales. Primero la presencia de altas concentraciones de magnesio en la muestra vuelve al espécimen inapropiado para el análisis de colesterol usando los métodos comunes de colesterol enzimático. Otra desventaja en el uso de este agente es que puede haber un alto grado de heterogeneidad en la preparación comercial de heparina, debido a la variación de su peso molecular. Esto en cambio puede llevar a incrementar la variabilidad lote a lote en el análisis de HDL.

Los procedimientos de sulfato de dextrano tienden a sobre estimar la verdadera concentración de HDL. El uso de sulfatos de dextrano de mayor peso molecular (50,000 daltones) puede producir valores de HDL que son uniformes con los métodos de heparina-cloruro de magnesio. Además, han sido desarrollados los métodos de cloruro-sulfato de dextrano-magnesio que son compatibles con las determinaciones enzimáticas de colesterol. [ref\(1231\)](#)

El fosfotungstato de sodio puede también producir una subestimación de concentraciones de HDL. Otra desventaja asociada con el uso de este agente en particular es que las fluctuaciones de temperatura y las diferencias de concentraciones de reactivo pueden ser las principales fuentes de error. Sin embargo, las modificaciones a este método de precipitación han resultado en una mejor precisión y exactitud para las determinaciones de HDL. [ref\(1232\)](#)

Un problema común a todos los métodos de precipitación ocurre con muestras que contienen concentraciones de triglicéridos aumentadas (> 4000 mg/L). La presencia de hipertrigliceridemia puede provocar precipitaciones incompletas de lipoproteínas no HDL, resultando que cantidades sustanciales de LDL y VLDL permanecen en solución con el HDL colesterol. La medición de colesterol en estas muestras con precipitaciones incompletas resultará en un falso incremento de valores de HDL. Las muestras con concentraciones de triglicéridos aumentadas pueden ser utilizadas para las determinaciones de HDL si ciertos pasos son tomados para asegurar la precipitación completa de todas las fracciones de lipoproteínas no HDL. En práctica de rutina, la precipitación de todos los LDL y VLDL en muestras con hipertrigliceridemia pueden ser obtenidas por la dilución de las muestras con solución salina al 0.9% y reprecipitación o uso de doble cantidad de agente precipitante en una muestra sin diluir.

Recientemente ha sido introducida la técnica de precipitación para le determinación de HDL basado en el uso de sulfato de dextrano en una unión covalente con hierro. El principio de este método es similar a aquel ensayo tradicional de precipitación excepto que luego que el complejo dextrano de sulfato-hierro se adhiere a las fracciones de lipoproteína de LDL y VLDL el fondo del tubo es colocado cerca de una fuerza magnética que “tira” las fracciones de LDL y VLDL fuera de la solución. Así, esta técnica elimina la necesidad de centrifugación. Además, este método es más robusto y no parece ser rápidamente afectado por una



precipitación incompleta de lipoproteínas conteniendo ApoB debida a la presencia de hipertrigliceridemia comparada con los otros métodos de precipitación.[ref\(1233\)](#)

Otros métodos de determinación de colesterol HDL incluyen cromatografía de intercambio de iones y electroforesis en gel de agarosa (ver el siguiente texto). Ninguno de estos métodos es utilizado en el laboratorio clínico de rutina para las determinaciones de HDL.

Muestras.

El suero y el plasma son aceptables para el análisis de concentraciones de HDL. Si se usa plasma, el anticoagulante de opción es EDTA. Aunque el ayuno no influye en las concentraciones de HDL sanguíneo, la hipertrigliceridemia que puede también presentarse en especímenes sin ayuno e interferir con algunos de los métodos de determinación de HDL. Aunque el uso del espécimen de ayuno es el preferido. Una vez recogida la muestra debe ser removida del coágulo en menos de dos horas y almacenada a 4° C hasta el análisis.

Intervalo de referencia.

Los intervalos de referencia para el colesterol HDL establecidos para hombres y mujeres blancas han sido dados en la Tabla 33-11. Además la Tabla 33-6 da los valores de corte de NCEP HDL que pueden ser usados para la clasificación de individuos respecto al riesgo de desarrollo de enfermedades coronarias. Las estrategias de diagnóstico y tratamiento están resumidas en Figs. 33-14 y 33-15.

Electroforesis de Lipoproteínas

Hebert K. Naito

Principios de análisis y uso corriente

La separación por electroforesis de las principales fracciones de lipoproteínas para la evaluación del perfil de una lipoproteína específica no es frecuentemente utilizada hoy en día en el laboratorio clínico, pues la mayoría de las dislipoproteinemias pueden ser clasificadas por determinaciones simples y baratas de concentraciones de colesterol total y triglicéridos, y una examen visual de una muestra de suero o plasma. El examen visual para indicar la presencia de quilomicrones flotantes o muestra turbida es realizada luego de que la muestra se deja reposar a 4° C a 8° C por un período de tiempo (usualmente toda la noche). Estos tests simples, acompañados por la determinación de HDL y LDL, han suplantado extensamente la electroforesis de lipoproteínas en el laboratorio clínico. Sin embargo, en ciertas situaciones la electroforesis de lipoproteínas puede ser de gran utilidad para identificar individuos con la rara hiperlipoproteinemia de Fredrickson tipo III (también llamada disbetalipoproteinemia) (ver Fig. 33-8). Esta disbetalipoproteinemia es caracterizada electroforéticamente por una gran mancha característica entre las bandas beta y prebeta. Este hallazgo puede ser de gran utilidad diagnóstica par identificar esta disbetalipoproteinemia.

La separación de lipoproteínas por electroforesis es similar en teoría y técnica a la separación electroforética de proteínas (ver capítulo 10) y por lo tanto no es discutido en detalle aquí. Críticas de la teoría y técnica electroforética se pueden encontrar en otros lugares.[ref\(1234\)](#)

El medio de soporte que es empleado en la separación electroforética de lipoproteínas es uno de los factores más críticos que conciernen a esta técnica. Los medios de soporte que

han sido usados incluyen papel, almidón, agarosa, poliacrilamida, agar, y acetato de celulosa.

El uso de papel como medio de soporte para la electroforesis de lipoproteínas ha sido reemplazado por agarosa. Sin embargo, el uso de papel como medio de soporte es considerado un método clásico para la electroforesis de lipoproteínas, y la clasificación de Fredrickson de hiperlipoproteinemia está basada en el sistema de papel electroforético. [refs\(1235\)](#)

El gel de almidón no ha sido usado nunca en gran extensión para la electroforesis de lipoproteínas. Se pueden preparar estos geles usando almidón de papa parcialmente hidrolizado, y estos geles separaran las lipoproteínas en base a la carga eléctrica y el tamaño molecular. [ref\(1236\)](#) Luego de separados mediante la electroforesis de gel de almidón, las lipoproteínas del suero migran para incrementar su movilidad como alfa-lipoproteínas, beta-lipoproteínas, lipoproteínas de baja densidad, y quilomicrones. En realidad, el tamaño molecular de la fracción de quilomicroón impide su entrada al gel de almidón. Hoy en día el uso de la electroforesis de gel de almidón esta limitado a la preparación de fracciones de lipoproteínas para investigaciones adicionales.

La agarosa es el medio de soporte más usado para la separación electroforética de lipoproteínas (Fig. 33-17). El gel de agarosa permite una mejor separación de las fracciones prebeta lipoproteína y beta lipoproteína cuando se compara con otros medios de soporte disponibles. La separación de fracciones de lipoproteínas con agarosa puede ser realizada en una hora, mientras que la electroforesis con papel o gel de almidón pueden llevar varios días. También, la clara matriz del gel de agarosa permite la cuantificación de las fracciones de lipoproteínas con el uso de un densitómetro para explorar. Finalmente, las fracciones de lipoproteínas obtenidas en un medio soporte de agarosa se aproximan más a los resultados de cuando las lipoproteínas son separadas con ultracentrifugación, método de referencia para el análisis de lipoproteínas.

La poliacrilamida, como el gel de almidón, separa las fracciones de lipoproteínas sobre la base de la carga eléctrica y tamaño molecular. La acción molecular de tamizado del gel de poliacrilamida (gel de almidón) provoca la migración mas lenta de la banda prebeta haciéndola migrar más lentamente que la banda beta (Fig. 33-18). El efecto de tamizado molecular del gel de poliacrilamida también provoca la separación de fracciones de lipoproteínas con un mayor grado de resolución cuando se compara con otros medios soportes. En realidad, el poder resolutivo del gel de poliacrilamida es tan bueno que algunos especímenes pueden presentar excesos de bandas, haciendo su interpretación difícil. El uso de poliacrilamida es más conveniente para muestras que producen patrones de lipoproteínas cuestionables o complicados con otros medios de soporte, como la agarosa. También, el tiempo que consume producir el gel de poliacrilamida limita el uso de esta técnica en la rutina de laboratorio clínico.

Otros medios de soporte que han sido usados incluyen acetato de celulosa y agar gel. Aunque el acetato de celulosa es todavía usado para la electroforesis de proteínas del suero, tiene desventajas que incluyen la tendencia de este medio para dar un falso incremento en la fracción beta lipoproteína, cuando se compara con otros métodos electroforéticos establecidos, y la necesidad de clarificar el gel posteriormente a la interpretación debido a un fondo manchado.

El gel de agar no es usado generalmente para la rutina de separación electroforética de lipoproteínas. Sin embargo, el uso de este medio tiene como utilidad la identificación de una lipoproteína sérica anormal definida como *lipoproteína-X* (Lp-X). Esta variante de lipoproteína está caracterizada por una gran cantidad de colesterol y fosfolípidos y una baja



cantidad de proteínas. La presencia de Lp-X esta asociada con la enfermedad de hígado colestático. Aunque la Lp-X migra en la misma posición como la beta lipoproteína en otro medio de soporte, en el gel de agar esta especie migra catódicamente a las beta lipoproteínas.^{ref(1237)} Por lo tanto, la presencia de Lp-X puede ser confirmada por medio de electroforesis usando el gel de agar como medio de soporte.

La visualización de lipoproteínas separadas puede ser obtenida por medio de manchas específicas de lípidos. “Oil red O” y “Fat red 7B”, son los colorantes más comúnmente usados.

Especímenes

Pueden ser utilizados suero o plasma para determinaciones de lipoproteínas por medio de electroforesis. Si se usa el plasma, el anticoagulante preferido es EDTA. Además del uso anticoagulante, EDTA también ayuda a preservar la integridad de especímenes inhibiendo la autooxidación de ácidos grasos no saturados y colesterol inducida por metales de ácidos grasos no saturados y colesterol. Las muestras deben ser obtenidas de individuos con un ayuno de 12 horas. Como el metabolismo de lipoproteínas es afectado por una variedad de condiciones patofisiológicas, se debe asegurar que la muestra obtenida sea representativa de un día normal del individuo. Por lo tanto, las muestras no deben ser recogidas de individuos que recientemente hayan experimentados cambios sustanciales en el consumo calórico, consumo alcohólico, pérdida o ganancia de peso, y cambios en la medicación. Además, los factores tales como enfermedad o herida aguda (como infarto de miocardio), o reciente cirugía pueden alterar dramáticamente el metabolismo de lipoproteínas. La recolección de muestras para el análisis de lipoproteínas debe ser evitada en individuos en estas condiciones.

Intervalos de referencia

El porcentaje de distribución de lipoproteínas séricas en niños y adultos se muestra en la Tabla 33-12.

Triglicéridos

Hebert K. Naito

Principios de análisis y uso corriente

La determinación de las concentraciones de triglicéridos en suero o plasma es útil para la evaluación y diagnóstico diferencial de hiperlipidemias primarias o secundarias y de la evaluación de los factores de riesgo para pancreatitis aguda. Además, las determinaciones exactas de triglicéridos son importantes por su rol en la estimación de la concentración de LDL colesterol por medio del uso de la ecuación de Friedewald:

$$\text{Colesterol LDL} = \text{Colesterol total} - (\text{colesterol VLDL} + \text{colesterol HDL})$$

donde el colesterol VLDL es igual a los triglicéridos dividido entre 5. La meta de precisión recomendada para la medición de triglicéridos es un CV% de $\leq 5\%$, y la meta de exactitud es de un ALAT desde un valor de referencia de no más de 5%. Metas similares para las mediciones de colesterol LDL son CV 4% y un 4% de sesgo.



Los métodos más antiguos de determinación de triglicéridos fueron procedimientos indirectos, basados en la sustracción de colesterol y fosfolípidos de la concentración de lípidos totales presentes en la muestra, [ref\(1238\)](#) donde el contenido de lípido remanente se atribuía a los triglicéridos. Los métodos corrientes para la determinación de triglicéridos usan procedimientos enzimáticos con la medición de concentración de glicérido glicerol. La cantidad de glicérido glicerol es proporcional a las concentraciones de triglicéridos en la muestra. Las concentraciones de glicérido glicerol pueden ser determinadas también por métodos químicos; sin embargo, este método es raramente realizado hoy en día en laboratorios clínicos (ver Métodos en Química Clínica [ref\(1239\)](#)).

Los métodos enzimáticos para la cuantificación de triglicéridos requieren primeramente la hidrólisis de ácidos grasos desde glicerol, con el uso de lipasa. El uso de enzimas para este paso ha sido posible por el desarrollo de métodos rápidos y automatizados. Además de la lipasa, es usualmente empleada en el paso de hidrólisis una enzima proteasa. El rol de la enzima proteasa en la hidrólisis de ácidos grasos desde glicerol no es todavía conocido; sin embargo, su inclusión en el sistema reactivo ayuda a asegurar la hidrólisis completa de triglicéridos. La alfa- quimotripsina es una proteasa comúnmente usada para este propósito. [ref\(1240\)](#) Luego de la producción de glicerol libre por medio de la hidrólisis enzimática de triglicéridos, una variedad de técnicas se pueden emplear para la determinación del glicerol que ha sido liberado.

Un método común emplea lipasa, glicerol cinasa, piruvato cinasa (PC), y lactodeshidrogenasa (LD) (Tabla 33-13, Método I). En este ensayo el glicerol es liberado de los triglicéridos por la acción de la lipasa, y luego el glicerol libre reacciona con el ATP en la presencia de glicerol cinasa produciendo glicerol-3-fosfato y ADP. El ADP formado en esta reacción es refosforilado por fosfoenolpiruvato, en una reacción catalizada por PC, para producir ATP y piruvato. En la reacción final de la secuencia, el piruvato es reducido enzimáticamente en la presencia de NADH por el LD, produciendo lactato y NAD. La disminución en absorción resultante del consumo de NADH es monitoreada a 340nm y es proporcional a las concentraciones de triglicéridos en la muestra.

Otro método enzimático comúnmente usado (Tabla 33-13, Método II) emplea la enzima L-alfa-glicerol fosfato oxidasa (GPO), que reacciona con el glicerol-3-fosfato formado por la reacción en secuencia de lipasa y glicerol cinasa descrita anteriormente. En la presencia de GPO y O₂, el glicerol-3-fosfato se oxida para producir dihidroxiacetona fosfato y peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno reacciona con un cromógeno en una reacción catalizada por peroxidasa de rábano, causando la oxidación del cromógeno y el cambio de color, que puede ser monitoreado. [ref\(1241\)](#)

Otro procedimiento para la determinación de triglicéridos utiliza el glicerol-3-fosfato producido en la reacción catalizada por la glicerol cinasa para dar un formazan altamente coloreado (Tabla 33-13, Método III). El glicerol-3-fosfato es oxidado primeramente por el NAD en una reacción catalizada por el glicerol-3- fosfato deshidrogenasa formando NADH. El NADH formado reacciona con 2-*p*-iodofenil-3-nitrofenil-5-feniltetrasolium, en una reacción catalizada por diaforasa, produciendo un formazan coloreado.

Los métodos de triglicéridos basados en las mediciones de absorción de NADH a 340nm deben utilizar un blanco de suero como parte del procedimiento de este ensayo. El blanco de suero se corrige por la presencia de componentes de suero que pueden absorber o esparcir luz a 340nm. Los métodos colorimétricos que están basados en la reducción de sales

de tetrazolium por medio de NADH y diaforasa y la medición de formazan coloreado resultante en el espectro visible no requiere una medición de muestra blanco. Sin embargo, estos métodos sufren la formación espontánea de formazan coloreado, que resulta en un aumento de la lectura de reactivo blanco.

Otro factor que puede afectar adversamente la exactitud de las mediciones de triglicéridos es el uso de pasos de blanqueo para corregir el glicerol libre presente en el suero. Los pasos de blanqueo son típicamente realizados en un análisis de dos partes. En la primer parte del análisis, se realizan todos los pasos necesarios para la medición de concentraciones de glicerol, excepto que la hidrólisis de triglicéridos no se realiza, este paso mide el glicerol libre. En la segunda parte del análisis, la reacción completa mide las concentraciones de glicerol total. La concentración actual de triglicérido está basada y calculada desde el nivel correcto de glicerol, que es, glicerol total menos el glicerol libre. El glicerol libre presente en el suero es producido como un resultado de lipólisis de triglicéridos almacenados y usualmente ocurre con concentraciones en el rango de 80 a 200 mg/L. [refs\(1242\)](#) Sin embargo, situaciones tales como estrés o estados de enfermedad pueden resultar en incrementos sustanciales en el porcentaje de lipólisis de tejido adiposo con un incremento resultante en la cantidad de glicerol libre presente en el suero. Además, los productos de glicerol o similares al glicerol pueden estar presentes en ciertas infusiones intravenosas dadas a los pacientes, con incrementos resultantes de glicerol libre contenido en el suero. [refs\(1243\)](#) Por lo tanto, aunque muchas fórmulas han sido desarrolladas para la corrección del contenido de glicerol libre en suero, su uso es restringido a individuos no estresados y con buena salud. Se debe destacar sin embargo, que aún en esta población las concentraciones de glicerol libre mayores a 750 mg/L no son infrecuentes. [ref\(1244\)](#)

Especímenes.

Suero y plasma pueden ser usados para la determinación de concentraciones de triglicéridos. Se debe establecer, sin embargo, que los valores de plasma son de alrededor de 2% a 4% menores que en el suero debido al efecto de dilución causado por la salida de agua de los eritrocitos producido por el anticoagulante. Los anticoagulantes como fluoruro, citrato, y oxalato pueden causar grandes cambios de agua desde los eritrocitos hacia el plasma, lo cual debe ser evitado. [ref\(1245\)](#) La sangre debe ser recogida para determinaciones de triglicéridos solamente si el paciente ha ayunado por un período mínimo de 10 a 12 horas. Las concentraciones de triglicéridos crecen en un lapso de 2 horas luego de comer y alcanzan su máximo luego de 4 a 6 horas. Así, en un paciente sin ayuno al cual se le ha extraído sangre para análisis de triglicéridos, un incremento en la concentración de triglicéridos es imposible de interpretar adecuadamente. Además, la concentración aumentada de quilomicrones en especímenes sin ayuno puede interferir en las mediciones de absorción en algunas determinaciones colorimétricas de triglicéridos.

Intervalos de referencia.

Las recomendaciones de NCEP han eliminado el uso de intervalos de referencia para triglicéridos. En cambio, el Panel de Expertos [refs\(1246\)](#) ha recomendado algunos valores de corte, como colesterol total, para simplificar el recuerdo de números de decisiones médicas importantes (ver Tabla 33-3).



Referencias

1. Fredrickson DS, Lees RS: Familial hyperlipoproteinemia. In Stanbury JB, Wyngaarden JB, Fredrickson DS, editors: *The metabolic basis of inherited disease*, ed 3, New York, 1982, McGraw-Hill.
2. Fredrickson DS, Levy RJ, Lees RS: Fat transport in lipoproteins: an integrated approach to mechanisms and disorders, *N Engl J Med* 276:32-44, 94-103, 148-156, 215-224, 273-281, 1967.
3. Gotto AM Jr, editor: *Plasma lipoproteins*, New York, 1987, Elsevier Science Publishers.
4. Scanu AM, Spector AA, editors: *Biochemistry and biology of plasma lipoproteins*, New York, 1986, Marcel Dekker.
5. Levy RJ, Rifkind BM, Dennis BH, Ernst N, editors: *Nutrition, lipids, and coronary heart disease*, New York, 1979, Raven Press.
6. Miller ME, Lewis B, editors: *Lipoproteins, atherosclerosis and coronary heart disease*, New York, 1981, American Elsevier Publishing.
7. Naito HK, editor: *Nutrition and heart disease*, New York, 1982, Spectrum Publications, Inc.
8. National Heart, Lung, and Blood Institute Consensus Conference on Treatment of Hypertriglyceridemia, *JAMA* 251:1196-1200, 1984.
9. Lewis LA, Oppl JJ, editors: *Handbook of electrophoresis, vol 1: Lipoproteinemia: basic principles and concepts; vol 2: Lipoproteins in disease*, Boca Raton, Fla., 1980, CRC Press.
10. Lewis LA, editor: *Handbook of electrophoresis, vol 3: Lipoprotein methodology and human studies*, Boca Raton, Fla., 1983, CRC Press.
11. Havel RJ: Familial dysbeta-lipoproteinemia, *Med Clin North Am* 66(2):441-454, 1982.
12. Scanu AM: Structural and functional polymorphism of lipoprotein(a): biological and clinical implications, *Clin Chem* 41:170-172, 1995.
13. The Expert Panel: Report of the National Cholesterol Education Program expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults, *Arch Intern Med* 148:36-39, 1988.
14. Second Expert Panel: Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel II), *Circulation* 89:1329-1445, 1994.
15. Havel RJ: Approach to the patient with hyperlipidemia, *Med Clin North Am* 66(2):319-333, 1982.
16. Rifkind BM, Levy RI, editors: *Hyperlipidemia: diagnosis and therapy*, New York, 1977, Grune & Stratton.
17. Naito HK, Kwak YS: Evaluation of a new high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) technology: selective separation of lipoproteins by magnetic precipitation, *Clin Chem* 41:S135, 1995.
18. Kris-Etherton PM, editor-in-chief: Risk factors for coronary heart disease. In *Cardiovascular disease: nutrition for prevention and treatment*, Chicago, Ill., 1990, American Dietetic Association.
19. The Expert Panel: *Report of the National Cholesterol Education Program Expert Panel on Blood Cholesterol Levels in Children and Adolescents*, U.S. Department of Health and Human Services, NIH publ no 91-2732, Bethesda, Md., Sept 1991, pp 1-119.
20. Gotto AM Jr, Farmer JA: Risk factors for coronary artery disease. In Braunwald E, editor: *Heart disease: a textbook of cardiovascular medicine*, ed 3, Philadelphia, 1988, Saunders.
21. Ross R: The pathogenesis of atherosclerosis. In Braunwald E, editor: *Heart disease: a textbook of cardiovascular medicine*, ed 3, Philadelphia, 1988, Saunders.
22. Naito HK: 18th Annual Symposium, National Academy of Clinical Biochemistry. Atherogenesis: current topics on etiology and risk factors, *Clin Chem* 41:132-133, 1995.
23. Grundy SM: Role of low-density lipoproteins in atherogenesis and development of coronary heart disease, *Clin Chem* 41:139-146, 1995.
24. Roheim PS, Asztalos BF: Clinical significance of lipoprotein size and risk for coronary atherosclerosis,



- Clin Chem* 41:147-152, 1995.
25. Malinow MR: Plasma homocyst(e)ine and arterial occlusive diseases: a mini-review, *Clin Chem* 41:173-176, 1995.
 26. Srinivasan SR, Berenson GS: Serum apolipoproteins A-I and B as markers of coronary artery disease risk in early life: the Bogalusa Heart Study, *Clin Chem* 41:159-164, 1995.
 27. Wilson WF: Relation of high-density lipoprotein subfractions and apolipoprotein E isoforms to coronary disease, *Clin Chem* 41:165-169, 1995.
 28. Zilversmit DB: Atherogenic nature of triglycerides, postprandial lipidemia, and triglyceride-rich remnant, *Clin Chem* 41:153-158, 1995.
 29. Strong JP: Natural history and risk factors for early human atherogenesis, *Clin Chem* 41:143-138, 1995.
 30. Wissler RW: Theories and new horizons in the pathogenesis of atherosclerosis and the mechanisms of clinical effects, *Arch Pathol Lab Med* 116:1281-1291, 1992.
 31. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, et al: Beyond cholesterol: modifications of low-density lipoproteins that increase its atherogenicity, *N Engl J Med* 320:915-923, 1989.
 32. Meade TW, Miller GJ, Rosenberg RD: Characteristics associated with the risk of arterial thrombosis and the prethrombotic state. In Fuster V, Verstraete M, editors: *Thrombosis in cardiovascular disorders*, Philadelphia, 1992, Saunders.
 33. NIH Consensus Development Conference: Lowering blood cholesterol to prevent heart disease, *JAMA* 253:2080-2086, 1985.
 34. Current status of blood cholesterol measurement in clinical laboratories in the United States: a report from the Laboratory Standardization Panel of the National Cholesterol Education Program, *Clin Chem* 34:193-201, 1988.
 35. Naito HK: Cholesterol: review of methods, Check Sample PTS 85-I, Chicago, 1985, *American Society of Clinical Pathology*, pp. 1-17.
 36. Naito HK: Cholesterol. In the CD-ROM by Kaplan LA, Pesce AJ, editors: *Clinical chemistry: a scientific and management infobase*, Cincinnati, Ohio, 1996, Pesce Kaplan Publishers.
 37. Kim E, Goldberg M: Serum cholesterol assay using a stable Liebermann-Burchard reagent, *Clin Chem* 15:1171-1179, 1969.
 38. Abell LL, Levy BB, Brodie BB, Kendall FE: Simplified methods for the estimation of the total cholesterol in serum and demonstration of its specificity, *J Biol Chem* 195:357-366, 1952.
 39. Pesce MA, Bodourian SH: Interference with the enzymic measurement of cholesterol in serum by use of five reagent kits, *Clin Chem* 23:757-760, 1977.
 40. Huang HS, Kuan JC, Guilbault GG: Fluorometric enzymatic determination of total cholesterol in serum, *Clin Chem* 21:1605-1608, 1975.
 41. Noma A, Nakayama K: Polarographic method for rapid micro-determination of cholesterol with cholesterol esterase and cholesterol oxidase, *Clin Chem* 22:336-340, 1976.
 42. Cooper GR: High density lipoprotein reference materials. In Lipel K, editor: *Report of the high density lipoprotein methodology workshop*, DHEW publ no NIH 79-1661, Washington, D.C., 1979, U.S. Government Printing Office, p 178.
 43. Kannel WB: Low high-density lipoprotein cholesterol and what to do about it, *Am J Cardiol* 70:810-814, 1992.
 44. Kerscher L, Schiefer S, Draeger B, et al: Precipitation methods for the determination of LDL-cholesterol, *Clin Biochem* 18:118-125, 1985.
 45. Van Handel E, Zilversmit BD: Micromethod for the direct determination of triglycerides, *J Lab Clin Med* 50:152-157, 1957.
 46. Bucolo G, David H: Quantitative determination of serum tri-glycerides by the use of enzymes, *Clin Chem* 19:476-482, 1973.
 47. Nagele U, Hagele EO, Sauer G, et al: Reagent for the enzymatic determinations of serum total triglycerides with improved lipolytic efficiency, *J Clin Chem Clin Biochem* 22:165-174, 1984.



48. Naito HK, David JA: Laboratory considerations: determination of cholesterol, triglyceride, phospholipid, and other lipids in blood and tissues. In Story JA, editor: *Lipid research methodology*, New York, 1984, Alan R Liss.
49. Stinshoff K, Weisshaar D, Staehler F, et al: Relation between concentrations of free glycerol and triglycerides in human sera, *Clin Chem* 23:1029-1032, 1977.
50. Lindblad BS, Settergren G, Feychting H, Persson B: Total parenteral nutrition in infants: blood levels of glucose lactate, pyruvate, free fatty acids, glycerol, d-beta-hydroxybutyrate, triglycerides, free amino acids, and insulin, *Acta Paediatr Scand* 66:409-419, 1977.
51. Alper C: Specimen collection and preservation. In Henry RJ, Cannon DC, Winkelman JW, editors: *Clinical chemistry: principles and techniques*, Hagerstown, Md., 1974, Harper & Row.

Tablas

Tabla 33-1. Descripción física y química de las lipoproteínas plasmáticas en humanos.

Características: Densidad (g/mL)
Quilomicrones: <1.006
VLDL: <1.006
IDL: 1.006-1.019
LDL: 1.019-1.063
HDL: 1.063-1.21
Características: Movilidad Electroforética
Quilomicrones: Origen
VLDL: Pre-beta
IDL: Beta
LDL: Beta
HDL: Alfa
Características: Velocidad de flotación (S_0)
Quilomicrones: >400
VLDL: 20-400
IDL: 12-20
LDL: 0-10
HDL: --
Características: Diámetro (nm)
Quilomicrones: 80-500
VLDL: 40-80
IDL: 24.5
LDL: 20
HDL: 7.5-12
Características: Lípidos (%en peso)
Quilomicrones: 98
VLDL: 92
IDL: 85
LDL: 79



HDL:	50
Características: Colesterol	
Quilomicrones:	9
VLDL:	22
IDL:	35
LDL:	47
HDL:	19
Características: Triglicéridos	
Quilomicrones:	82
VLDL:	52
IDL:	20
LDL:	9
HDL:	3
Características: Fosfolípidos	
Quilomicrones:	7
VLDL:	18
IDL:	20
LDL:	23
HDL:	28
Características: Apoproteínas (%en peso)	
Quilomicrones:	2
VLDL:	8
IDL:	15
LDL:	21
HDL:	50
Características:	Principal
Quilomicrones:	A-I,A-II
VLDL:	B-100
IDL:	B-100
LDL:	B-100
HDL:	A-I,A-II
Quilomicrones:	B-48
VLDL:	C-I,C-II,C-III
IDL:	C-I,C-II,C-III
HDL:	C-I,C-II,C-III
Quilomicrones:	C-I,C-II,C-III
VLDL:	E
IDL:	E
Características:	Menor
Quilomicrones:	B-100
VLDL:	A-I,A-II
IDL:	B-48
LDL:	C-I,C-II,C-III
HDL:	B-100



Quilomicrones:	D
VLDL:	B-48
LDL:	E-II,E-III,E-IV
HDL:	D
Quilomicrones:	E-II,E-III,E-IV
HDL:	E-II,E-III,E-IV

Tabla 33-2. Causas de hiperlipidemias secundarias.

Patrones	Causas
Hiperquilomicronemia	Diabetes mellitus insulínopénica Disglobulinemia Lupus eritematoso Pancreatitis
Hiperbetalipoproteinemia	Síndrome nefrótico Hipotiroidismo Enfermedad obstructiva hepática Porfiria Mieloma múltiple Cirrosis portal Hepatitis viral aguda Mixedema Estrés Anorexia nerviosa Hipercalcemia idiopática
Disbetalipoproteinemia	Hipotiroidismo Disgamaglobulinemia Mixedema Cirrosis biliar primaria Acidosis diabética
Hiperbetalipoproteinemia	Diabetes mellitus Síndrome nefrótico Embarazo Uso de hormonas(contraceptivos orales) Enfermedad de almacenaje de glucógeno Alcoholismo Enfermedad de Gaucher Enfermedad de Nieman-Pick Pancreatitis Hipotiroidismo Disglobulinemia
Tipos mixtos de lipoproteinemia	Síndrome nefrótico Diabetes mellitus insulínopénica Alcoholismo



Mieloma Hipercalcemia idiopática Pancreatitis Macroglolulinemia Diabetes mellitus (insulino dependiente)

Tabla 33-3. Programa Nacional para la Educación del Colesterol Clasificación de las recomendaciones para los riesgos de triglicéridos.

Triglicérido mg/L	Riesgo
Menos de 2000	Normal
2000-4000	Limite alto
4000-10000	Alto
Mayor que 10000	Muy alto
Consenso del Instituto Nacional de Corazón, Pulmón y Sangre. Conferencia sobre el tratamiento de la Hipertriglicemia, Jama 251 :1196-1200 1984 y del segundo Panel de Expertos: Detección; Evaluación y Tratamiento de Colesterol Alto en Adultos (Tratamiento de Adultos Panel II) Circulation 89:1329-1445, 1994.	

Tabla 33-4. Clasificación del riesgo en adultos basado en el colesterol total y colesterol de lipoproteína de baja densidad.

Colesterol total (mg/L)*	Clasificación del riesgo	LDL colesterol (mg/L)
< 2000	Deseable	< 1300
2000-2390	Línea límite alta	1300-1590
> 2400	Alta	> 1600
Del Reporte del Panel de Expertos en Detección, Evaluación y Tratamiento de Colesterol Sanguíneo Alto del Programa de Educación Nacional de Colesterol, Arch Intern Med 148:36-39, 1988, y del Segundo Panel de Expertos: Detección, Evaluación, y Tratamiento de Colesterol Sanguíneo Alto en Adultos (Adult Treatment Panel II), Circulación 89: 1329-1445, 1994. *Miligramos de colesterol por litro de sangre; para convertir mg/L de colesterol a mmol/L, dividiendo por 387 o multiplicando por 0.002586.		



Tabla 33-5. Factores de riesgo asociados con el desarrollo de enfermedad cardíaca coronaria.

Factores de riesgo positivos
Edad (años)
Hombre ≥ 45
Mujer ≥ 55 o premenopáusicas prematuras sin terapia de reemplazo de estrógenos
Historia familiar de prematura enfermedad cardíaca coronaria
Fumador corriente
Hipertensión
Diabetes mellitus
Bajo HDL colesterol, < 350 mg/L (0.9 mmol/L)
Factores de riesgo negativos
Alto HDL colesterol, > 600 mg/L (1.6 mmol/L)

Tabla 33-6. Valores de corte para riesgo de enfermedades cardíacas coronarias basados en los niveles de HDL colesterol.

Clasificación	Valor de corte de HDL colesterol
Riesgo de enfermedad cardíaca coronaria positivo	< 350 mg/L
Riesgo de enfermedad cardíaca coronaria negativo	> 600 mg/L
Del Segundo Panel de Expertos: Detección, Evaluación, y Tratamiento de Colesterol Sanguíneo Alto en Adultos (Adult Treatment Panel II), Circulación 89:1329-1445, 1994.	

Tabla 33-7. Recientes recomendaciones del NECP para niños y adolescentes.

Colesterol total (mg/L)	Clasificación de riesgo	LDL colesterol (mg/L)
< 1700	Aceptable	< 1100
1700-1990	Línea límite alta	1100-1290
≥ 2000	Alto	≥ 1300
NECP, Programa Nacional de Educación de Colesterol. Del Panel de Expertos: Reporte del Panel de Expertos en Niveles de Colesterol Sanguíneos		



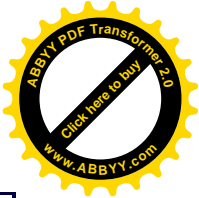
en Niños y Adolescentes del Programa Nacional de Educación del Colesterol, U.S. Departamento de Salud y Servicios Humanos, NIH publ no 91-2732, Sept 1991, pp 1-119. También del Scanu AM; Clin Chem 41:170-173, 1995.

Tabla 33-8. Decisiones de tratamiento basadas en las concentraciones de HDL colesterol.

ECC y estado de factores de riesgo	Nivel de decisión de LDL colesterol mg/L (mmol/L)	Modalidad de tratamiento
Sin CDH y <2 factores de riesgo	> 1600 (4.1)	Dieta
	> 1900 (4.9)	Droga
Sin CDH y > 2 factores de riesgo	> 1300 (3.4)	Dieta
	> 1600 (4.1)	Droga
Con CDH	> 1000 (2.6)	Dieta
	> 1300 (3.4)	Droga
Modificado del Segundo Panel de Expertos: Detección, Evaluación, y Tratamiento de Colesterol Sanguíneo Alto en Adultos (Adult Treatment Panel II), Circulación 89;1329-1445, 1994.		

Tabla 33-9. Métodos para análisis de colesterol.

Método: 1. Liebermann-Burchard (L-B)
Clasificación del método: Colorimétrico
Principio: El colesterol es extraído y reacciona con un ácido fuerte (ácido sulfúrico) y anhídrido acético para formar un producto coloreado con máxima absorbancia a 410nm
Uso: Raramente usado
Comentarios: El colesterol esterificado produce mayor cambio de color que el no esterificado
Método: 2. Abell et al. ref(1247)
Clasificación del método: Colorimétrico
Principio: Los ésteres de colesterol son químicamente hidrolizados (saponificación), y el colesterol total es medido por la reacción de L-B
Uso: Considerado método de referencia corriente Raramente usado
Comentarios: Laborioso
Método: 3. Enzimático de punto final



Clasificación

del método: Colorimétrico

Principio: 1. Esteres de colesterol $\xrightarrow{\text{Colesterol esterasa}}$ Colesterol + Ácidos grasos

2. Colesterol + O₂ $\xrightarrow{\text{Colesterol oxidasa}}$ Colest-4-en-3-ona + H₂O₂

El H₂O₂ producido en la reacción 2 es utilizado en las reacciones A o B:

A. 2H₂O₂ + Fenol + 4-Aminofenazona $\xrightarrow{\text{Peroxidasa}}$ Quinoneimina color + 4 H₂O

B. H₂O₂ + Etanol $\xrightarrow{\text{Catalasa}}$ Acetaldehído + H₂O

Acetaldehído + NADP $\xrightarrow[\text{deshidrogenasa}]{\text{Aldehído}}$ Acetato + NADPH + H⁺

Uso: El método más común

Comentarios: Seguro y fácilmente automatizable
Posible método futuro de referencia

Tabla 33-10. Métodos para el análisis de HDL colesterol.

Método	Principio	Usos	Comentario
1.Ultra-centrifugación	El espécimen se ajusta a la densidad de 1.063 g/mL con bromuro de potasio; se centrifuga a alta velocidad por 24 horas; las lipoproteínas son separadas por densidad, con la fracción de HDL entre 1.063 y 1.21 g/mL.	Uso en investigación	Método de laborioso y referencia; consume mucho tiempo
2.Precipitación	El agente precipitante es usado para precipitar las mayores lipoproteínas conteniendo Apo-B; el colesterol remanente en el sobrenadante	Es la técnica más frecuentemente usada	Método corriente de elección

es cuantificado como HDL colesterol		
a.Heparina-cloruro de magnesio	Uso infrecuente	No compatible con todos los procedimientos de colesterol
b.Dextran sulfato	Comúnmente usado	Uso de moléculas de dextrano de bajo PM puede producir resultados malos; Dextranos de alto PM dan resultados excelentes. Compatible con procedimientos enzimáticos
c.Fosfotungsteno	Más comúnmente usado	Subestima el HDL, sensible a fluctuaciones de temperatura
d.Polietilenglicol	Frecuentemente usado	Pobre en exactitud y precisión, no recomendado

Tabla 33-11. Percentiles quinto y 95^{avo} para concentraciones de HDL colesterol plasmático en hombres y mujeres blancas en mg/L (mmol/L)

Edad (años)	Percentil			
	Hombres		Mujeres	
	5	95	5	95
5-9	380 (0.98)	740 (1.91)	360 (0.93)	730(1.89)
10-14	370 (0.96)	740 (1.91)	370 (0.96)	700 (1.81)
15-19	300 (0.78)	630 (1.63)	350 (0.91)	740 (1.91)
20-24	300 (0.78)	630 (1.63)	330 (0.85)	790 (2.04)
25-29	310 (0.80)	630 (1.63)	370 (0.96)	830 (2.15)
30-34	280 (0.72)	630 (1.63)	360 (0.93)	770 (1.99)
35-39	290 (0.75)	620 (1.60)	340 (0.88)	820 (2.12)
40-44	270 (0.70)	670 (1.73)	340 (0.88)	880 (2.28)
45-49	300 (0.78)	640 (1.66)	340 (0.88)	870 (2.25)
50-54	280 (0.72)	630 (1.63)	370 (0.96)	920 (2.38)
55-59	280 (0.72)	710 (1.80)	370 (0.96)	910 (2.35)



60-64	300 (0.78)	740 (1.91)	380 (0.98)	920 (2.38)
65-69	300 (0.78)	780 (2.02)	350 (0.91)	980 (2.53)
70 +	310 (0.80)	750 (1.94)	330 (0.85)	920 (2.38)

Tabla 33-12. Porcentaje de distribución de las fracciones de lipoproteínas en niños y adultos.

Edad (años)	Sexo	Lipoproteínas (%), X + SD		
		Beta	Prebeta	Alfa
Niños(4-14)	M,F	55 + 5	12 + 3	33 + 3
Adultos (18-65)	M	65 + 8	12 + 4	23 + 4
Adultos (18-65)	F	60 + 6	8 + 4	32 + 5

Tabla 33-13. Métodos para el análisis de triglicéridos.

Método:	1. Piruvato cinasa ultravioleta
Tipo de análisis:	Enzimático
Principio:	1. Triglicérido [lipasa proteasa] \longrightarrow Glicerol + ácidos grasos 2. Glicerol + ATP [glicerol cinasa] \longrightarrow Glicerol-3-fosfato + ADP 3. ADP + Fosfoenolpiruvato Piruvato [PC] \longrightarrow ATP + Piruvato 4. Piruvato + NADH [Lactato deshidrogenasa] \longrightarrow Lactato + NAD Disminución en la absorbancia a 340nm por desaparición de NADH proporcional a la concentración de triglicéridos
Usos:	Suero, plasma
Comentarios:	Buena sensibilidad, especificidad, y precisión; requiere blanco de suero, frecuentemente usado
Método:	2. Glicerol fosfato oxidasa (GPO)
Tipo de análisis:	Enzimático colorimétrico
Principio:	Usa las reacciones 1 y 2 descritas arriba, luego: GPO $3. \text{ Glicerol-3-fosfato} + \text{O}_2 \longrightarrow \text{Dihidroxiacetona fosfato} + \text{H}_2\text{O}_2$ $4. \text{ H}_2\text{O}_2 + 4\text{-clorofenol} + 4\text{-aminofenazona} +$ Peroxidasa $\text{hexacianoferrato de K (II)} \longrightarrow 4\text{-p-Benzoquinona}$ $\text{monoiminofenazona} + \text{hexacianoferrato de K (III)} + \text{HCl} + \text{H}_2\text{O}$

Formación de quinona monoimina coloreada proporcional a la concentración de triglicéridos

Usos: Suero, plasma

Comentarios: Buena sensibilidad, especificidad, y precisión; requiere blanco de suero, frecuentemene usada

Método: 3. Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPD)

Tipo de análisis: Enzimático Colorimétrico

Principio: Utiliza las reacciones 1 y 2 descritas en método 1, luego:
GPD

3. Glicerol-3-fosfato + NAD^+ \longrightarrow Dihidroxiacetona fosfato

4. $\text{NADH} + 2\text{-}p\text{-iodofenil-3-}p\text{-nitrofenil-tetrazolium (oxidado)}$
[diaforasa] \longrightarrow $2\text{-}p\text{-iodofenil-3-}p\text{-nitrofenil-tetrazolium}$
(reducido) + NAD^+

Producción de formazan coloreado proporcional a la concentración de triglicéridos

Usos: Suero, plasma

Comentarios: Buena sensibilidad, especificidad, y precisión; requiere blanco de suero, frecuentemene usada

Figuras

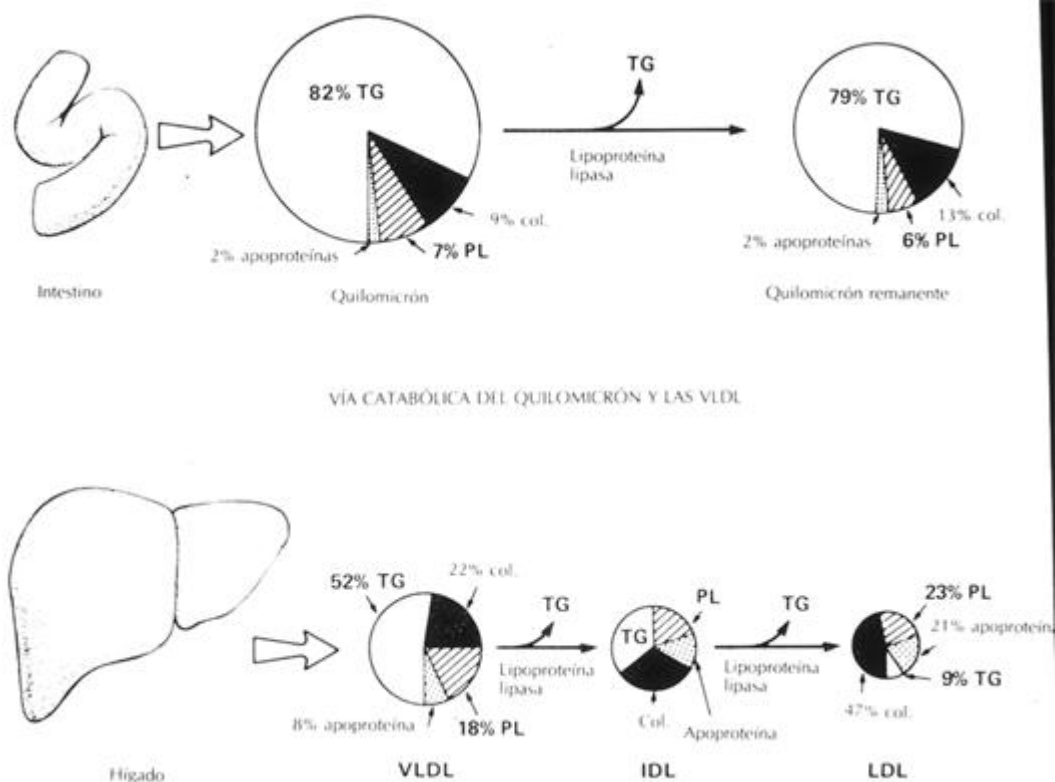
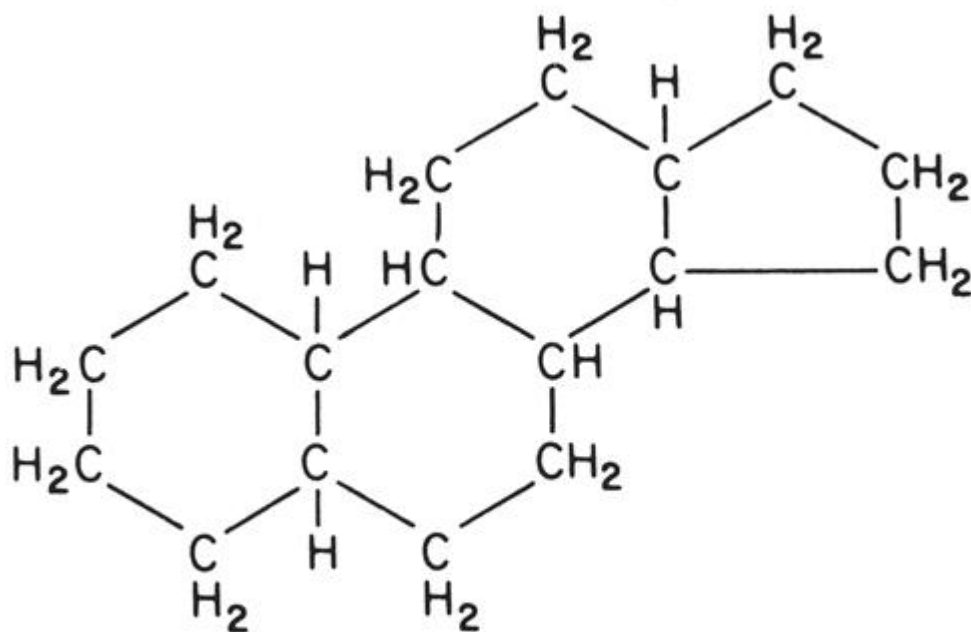


Figura 33-1 Origen y camino catabólico de quilomicron y lipoproteína de muy baja densidad (VLDL). El producto final del quilomicron es el quilomicron remanente; el producto final del VLDL es LDL. *Chol*, colesterol; *PL*, fosfatidillecitina; *TG*, triglicérido.



Ciclopentanoperhidrofenantreno

Figura 33-2 Estructura química del anillo ciclopentanoperhidrofenantreno. Esta estructura común de cuatro anillos es la estructura básica de todos los esteroides.

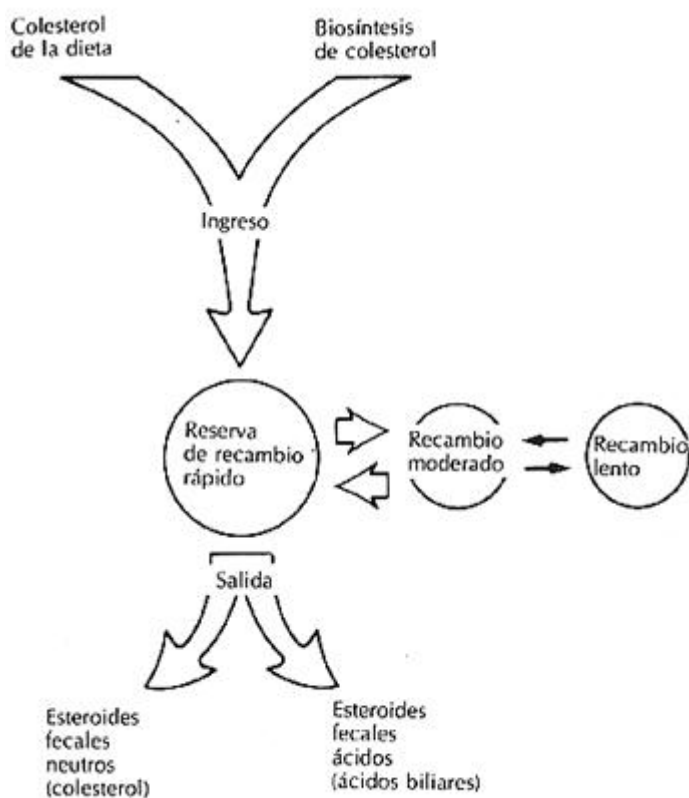


Figura 33-3 Esquema de la dinámica del metabolismo del colesterol.

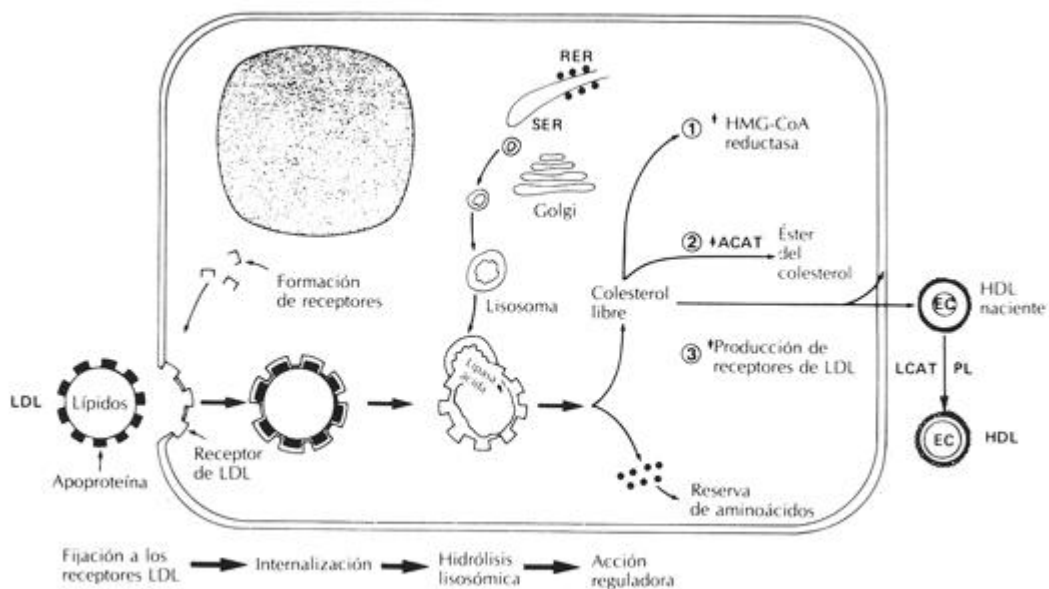


Figura 33-4 Esquema de la incorporación y catabolismo de LDL por la célula. El mecanismo no solamente depura LDL desde la circulación sino también ayuda en la

regulación de síntesis y almacenamiento de colesterol. Las lipoproteínas de alta densidad, HDL, juegan una función integral en la remoción de colesterol celular, esterificación de colesterol libre en sangre y transporte de colesterol al hígado para su catabolismo. *ACAT*, Acil-CoA: colesterol aciltransferasa; *ECC*, éster de colesterol; *HMG-CoA reductasa*, β -hidroxi- β -metilglutaril-coenzima A reductasa; *LCAT*, lecitin-colesterol aciltransferasa; *PL*, fosfolípido; *RER*, retículo endoplasmático rugoso; *SER*, retículo endoplasmático liso.



Figura 33-5 Camino metabólico de la síntesis de colesterol, acentuando el paso de inhibición por producto final de retroalimentación negativa en el paso de β -hidroxi- β -metilglutaril CoA con la enzima importante HMG-CoA reductasa.

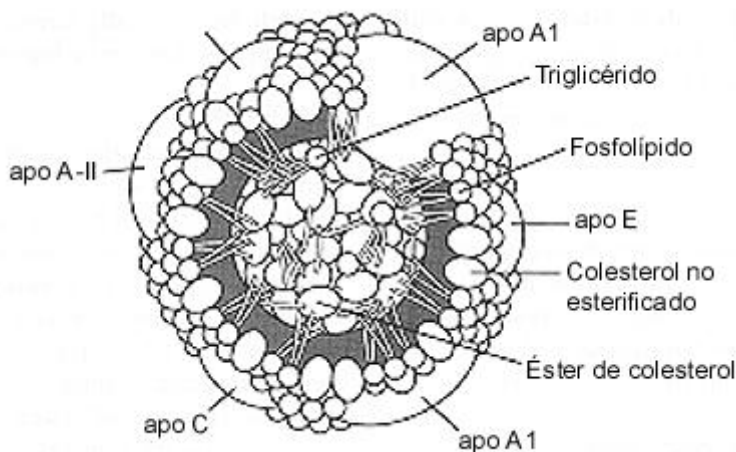


Figura 33-6 Esquema de un complejo de lipoproteína mostrando la superficie externa polar y el núcleo relleno con lípidos neutros. HDL, lipoproteína de alta densidad. (Modificado desde Grundy SM: *Slide atlas of lipid disorders: cholesterol, atherosclerosis, and coronary heart disease*, Nueva York, 1990, Editorial médica Gower.)

	ULTRA - CENTRIFUGACIÓN	S_f	DENSIDAD (gm/ml)	TAMAÑOS MOLECULARES RELATIVOS (Å)	ELECTROFORESIS EN AGAROSA
Quilomicrones visibles (normalmente ausentes después de 12 h de ayuno)		>400	0,95	● > 800	QUILO
Lipoproteínas de muy baja densidad		400	1,006	⊕ 800	
		20		⊕ 300	
Lipoproteínas de densidad intermedia,		12-20	1,006	● ~ 245	BETA
lipoproteínas de baja densidad		0-10	1,063	● 200	PreBETA
Lipoproteínas de alta densidad			1,21	○ 75- 120	ALFA
Complejos albúmina- ácidos grasos					

Figura 33-7 Caracterización general de los principales tipos de lipoproteínas, de donde se observan algunas propiedades químicas y físicas básicas. S_f , índice de flotación de Svedberg; *quilo*, quilomicrones; *beta*, beta-lipoproteína; *prebeta*, una lipoproteína de muy baja densidad; *alfa*, alfa-lipoproteína.

	Patrón electroforético	Plasma en reposo 24 h a 4° C	Coles-terol	Trigli-céridos	Tratamiento dietético	Drogas
Tipo I (muy raro)	Quilomicrones ↑↑↑ quilo β pre β α - Migración → +	Capa cremosa sobre plasma claro	↕	↑↑↑	1. Restricción de las grasas a 35 g/día 2. Suplementación con triglicéridos de cadena mediana 3. Restricción de la ingestión de alcohol	Ninguna efectiva en la actualidad
Tipo IIa (común)	LDL ↑↑↑ β pre β α	Claro	↑↑↑	↔	1. Dieta pobre en colesterol (< de 300 mg/día) 2. Menor ingestión de grasas saturadas (S) 3. Mayor ingestión de grasas poliinsaturadas (P) 4. Relación P/S: 1-1,2	1. Colestiramina, 16-24 g/día 2. Ácido nicotínico, 3 g/día 3. Probucol, 1 g/día 4. Colestipol, 4-6 sobres/día
Tipo IIb (común)	LDL ↑↑↑ VLDL ↑ β pre β α	Claro a levemente turbio	↑↑↑	↑	1. Reducción del peso corporal al ideal 2. Dieta pobre en colesterol (< de 300 mg/día) 3. Menor ingestión de grasas poliinsaturadas 4. Relación P/S: 1-1,2	1. Colestiramina, 16-24 g/día 2. Ácido nicotínico, 3 g/día 3. Probucol, 1 g/día 4. Colestipol, 4-6 sobres/día
Tipo III (muy raro)	B-VLDL y LDL de composición anormal β pre β α	Levemente turbio a turbio	↑↑	↑↑	1. Reducción del peso corporal al ideal 2. Dieta pobre en colesterol (< de 300 mg/día) 3. Menor ingestión de grasas saturadas 4. Restricción de alcohol	1. Clofibrato, 2 g/día
Tipo IV (muy común)	VLDL ↑↑↑ β pre β α	Claro, turbio o lechoso	↕	↑↑↑	1. Reducción del peso corporal al ideal 2. Restricción de hidratos de carbonos un 40% de calorías 3. Sustituir grasas poliinsaturadas por saturadas 4. Restringir alcohol 5. Reducir ingestión de colesterol a 300-400 mg/día	1. Clofibrato, 2 g/día 2. Ácido nicotínico, 3 g/día
Tipo V (raro)	Quilomicrones ↑↑ VLDL ↑↑↑ quilo β pre β α	Capa cremosa sobre plasma lechoso	↑↑↑	↑↑	1. Reducción del peso al ideal 2. Reducción de grasas hasta un 30% de las calorías diarias 3. Alcohol se desaconseja 4. Reducir ingestión de colesterol a 300-400 mg/día	1. Ácido nicotínico, 3 g/día 2. Clofibrato, 2 g/día 3. Oxandrolona, 2,5 mg t.i.d.

Figura 33-8 Resumen de los seis tipos de lipoproteínas. Abreviaturas igual que en la **Figura 33-7.**

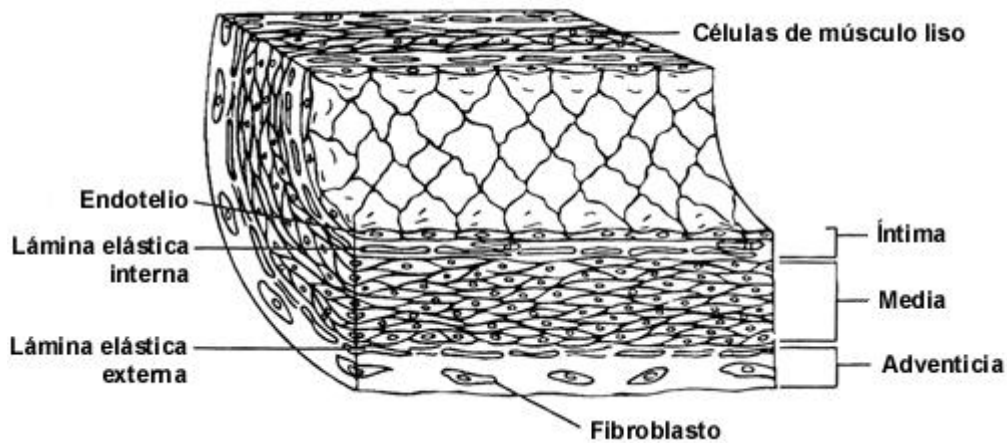


Figura 33-9 Diagrama de un vaso sanguíneo saludable (arteria) con integridad normal de la íntima, media y adventicia. (Modificado desde Grundy SM: *Slide atlas of lipid disorders: cholesterol, atherosclerosis, and coronary heart disease*, Nueva York, 1990, Editorial Médica Gower.)

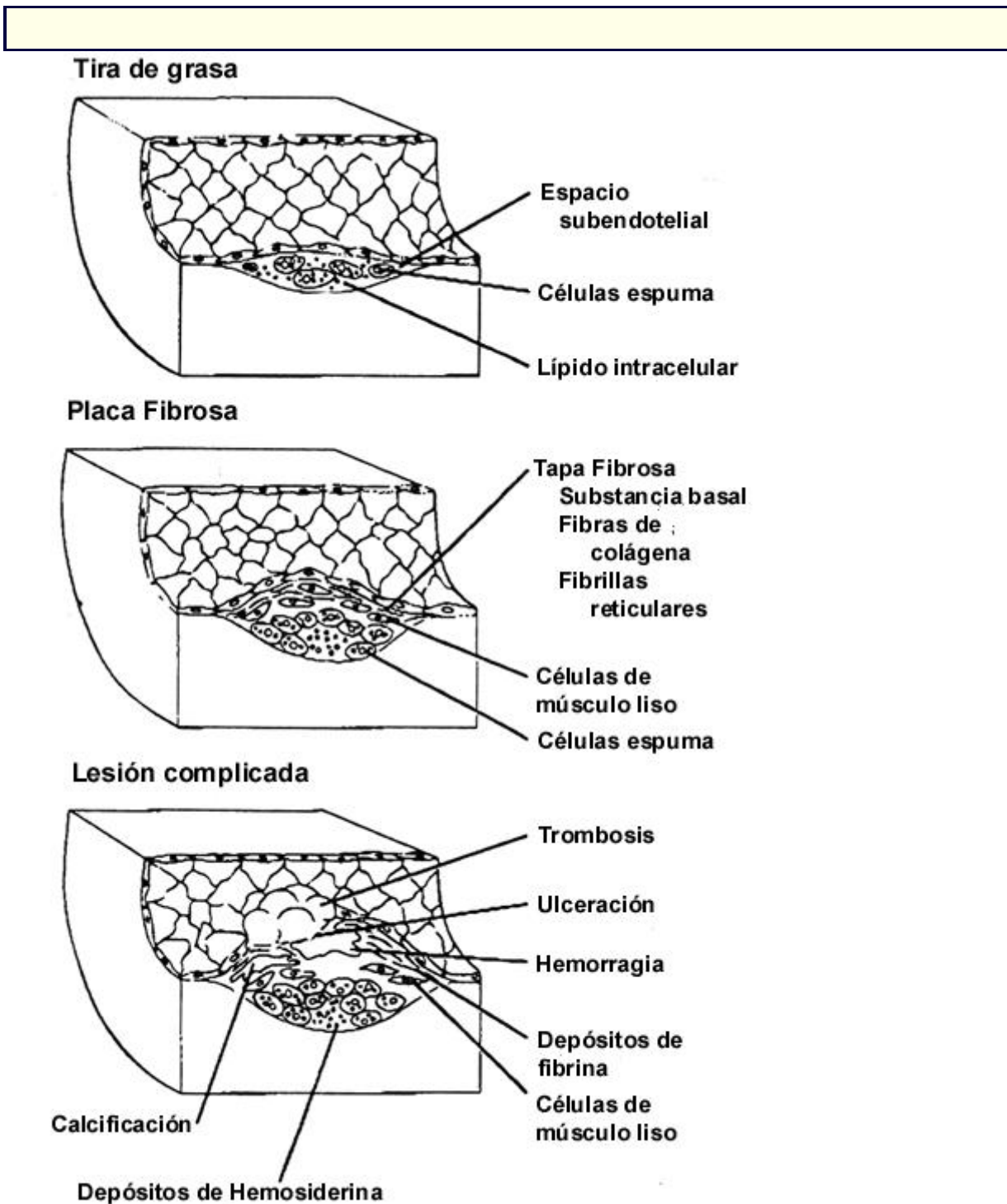


Figura 33-10 Los tres estados de aterogénesis: formación de la vena grasosa, placa fibrosa y lesión complicada. Notar el desarrollo y acumulación de las células espumosas en la vena grasosa, acumulación de células de músculo liso en la placa fibrosa, y formación de calcificación, ulceración, trombosis y hemorragia en la lesión avanzada o complicada. (Modificado desde Grundy SM: *Slide atlas of lipid disorders: cholesterol, atherosclerosis, and coronary heart disease*, Nueva York, 1990, Editorial Médica Gower.)

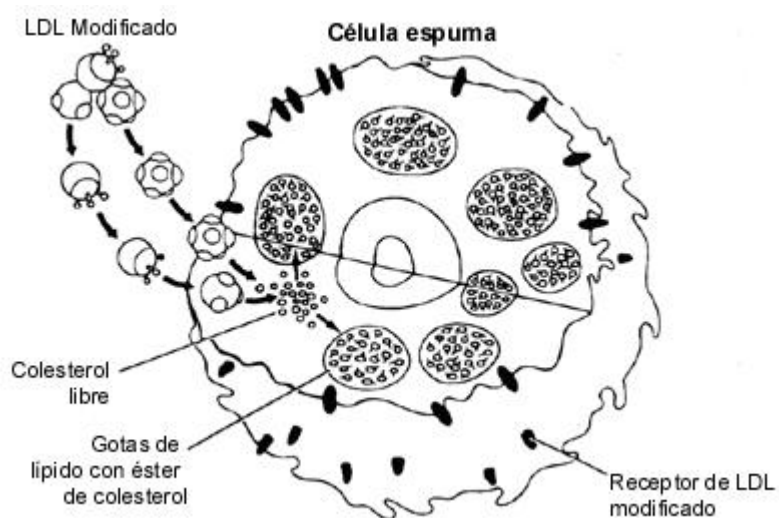


Figura 33-11 Formación de la célula espumosa: captación macrófaga (ingestión) de LDL modificado por el camino de receptor de LDL modificado, lo cual resulta en el desarrollo de grandes gotitas cargadas de grasa. Este proceso de formación de la célula espumosa es la marca característica del desarrollo de la vena grasa en la aterogénesis. (Modificado desde Grundy SM: *Slide atlas of lipid disorders: colesterol, atherosclerosis, and coronary heart disease*, Nueva York, 1990, Editorial Médica Gower.)

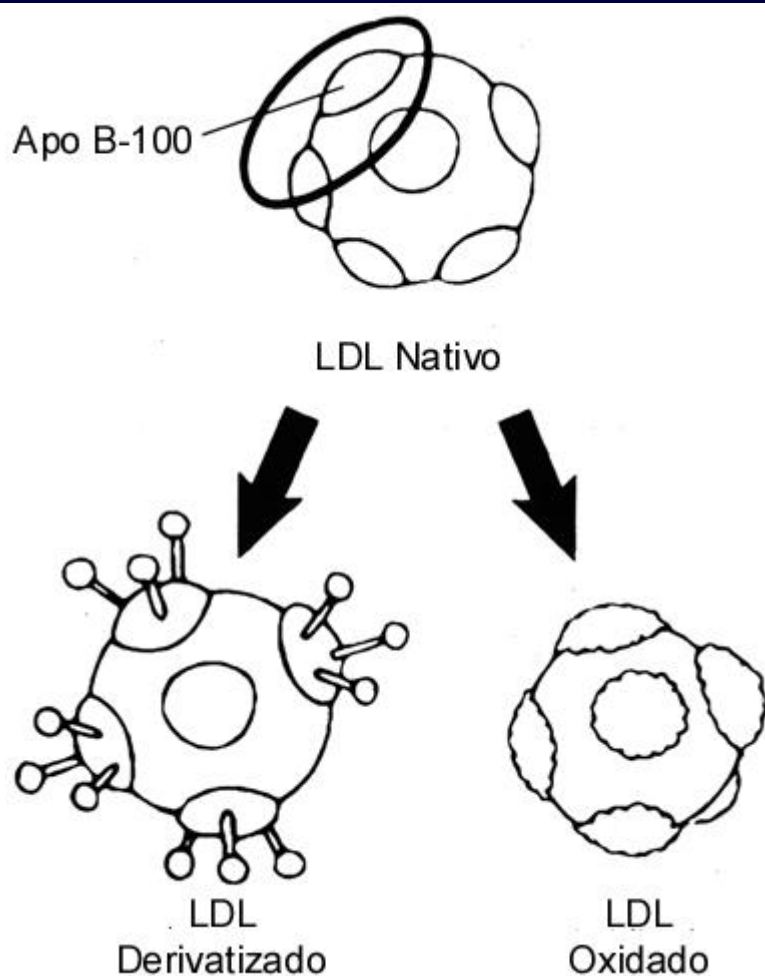


Figura 33-12 Modificación del LDL. LDL nativa secuestrada (en el espacio subendotelial) pueden experimentar dos tipos de modificación – derivación (enlace a manolaldehído o glicosidación de Apo B-100) u oxidación (degradación de Apo B-100 por superóxidos). (Modificado desde Grundy SM: *Slide atlas lipid of disorders: colesterol, atherosclerosis, and coronary heart disease*, Nueva York, 1990, Editorial Médica Gower.)

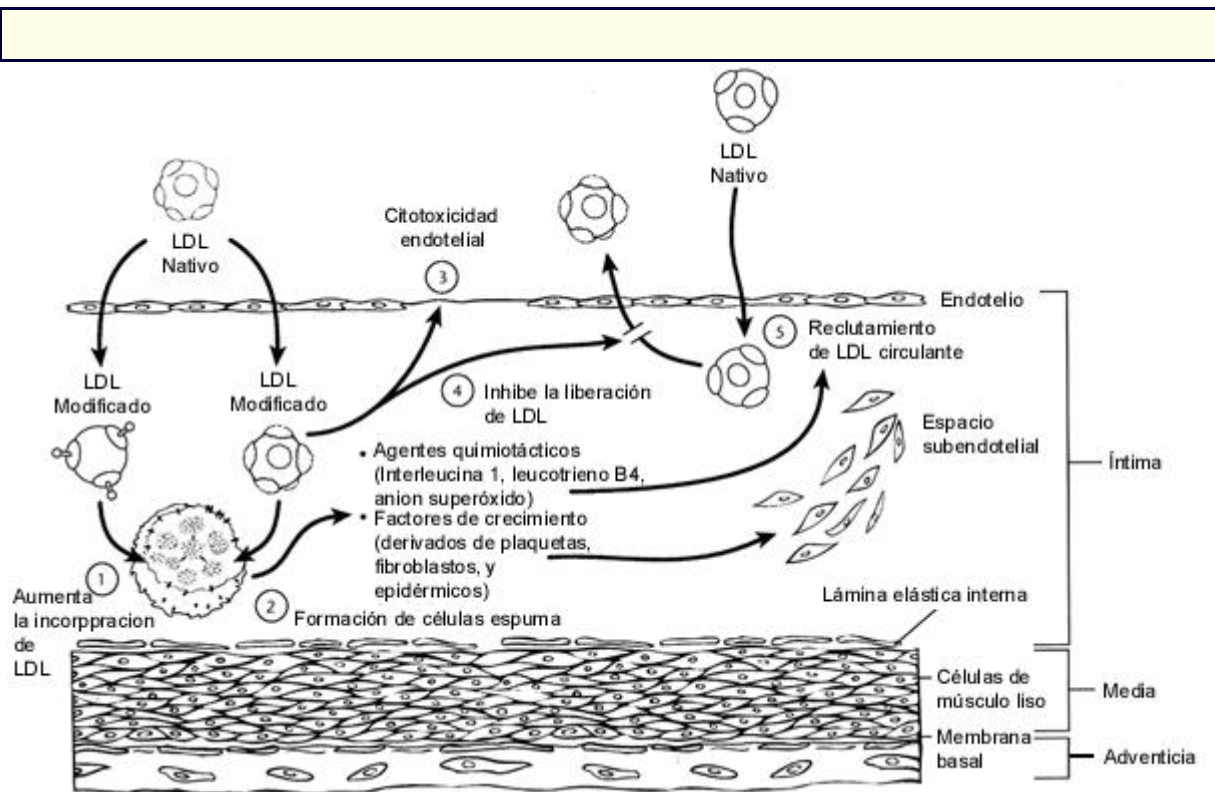


Figura 33-13 Hipótesis de las múltiples funciones de LDL oxidado en la aterogénesis.
(Desde Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, et al: *N Engl J Med* 320:915-923, 1989.)

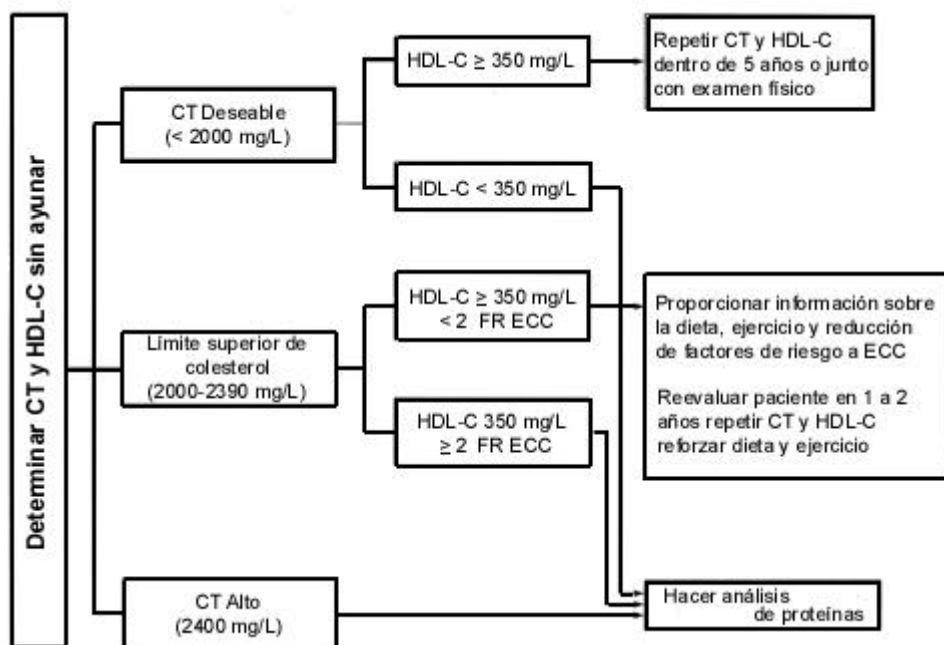


Figura 33-14 Algoritmo de estimación de riesgo de enfermedades cardíacas coronarias, tratamiento y monitoreo usando los lineamientos del NCEP, Panel II sobre Tratamiento de Adultos para prevención primaria en adultos con y sin evidencia de CDH. Clasificación inicial basada en las concentraciones de TC (colesterol total) y HDL-C (colesterol de lipoproteína de alta densidad). *PE*, examen físico; *RF*, factor de riesgo.

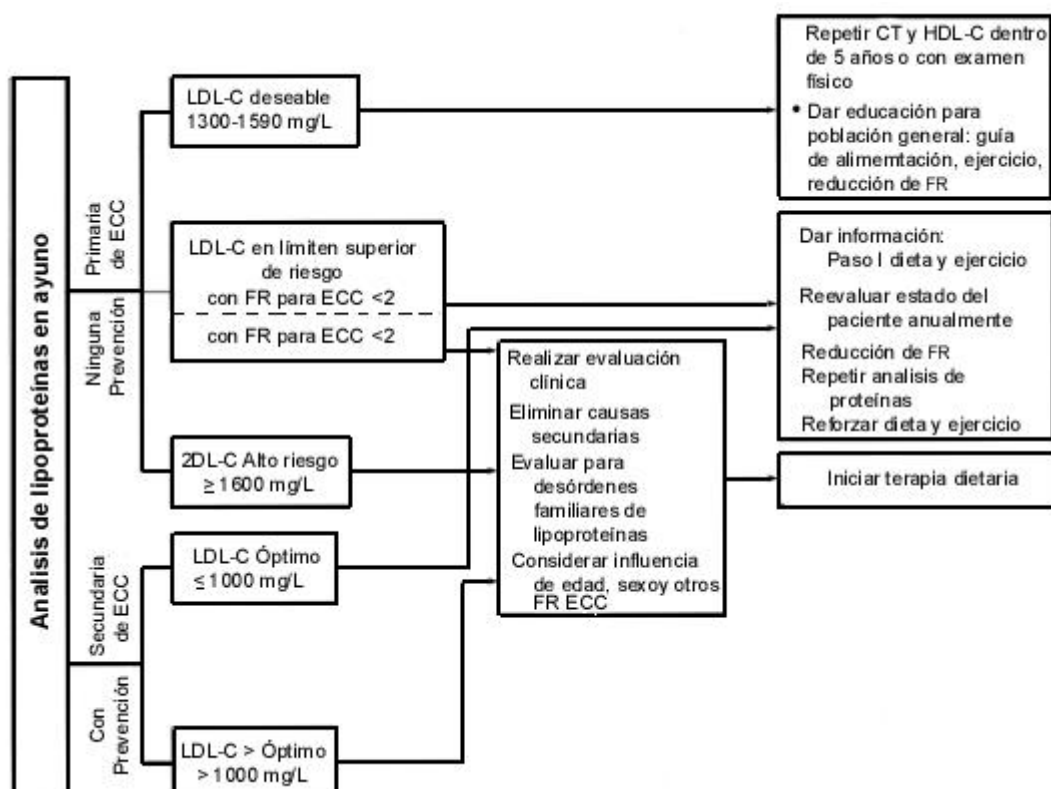


Figura 33-15 Algoritmo estimación de riesgo de CDH, tratamiento, y monitoreo para prevención primaria y secundaria de CDH en adultos con y sin evidencia de CDH. [ref\(1248\)](#) La clasificación subsecuente del riesgo esta basada en la concentración de colesterol de lipoproteína de baja densidad (LDL-C). *RF*, factor de riesgo.

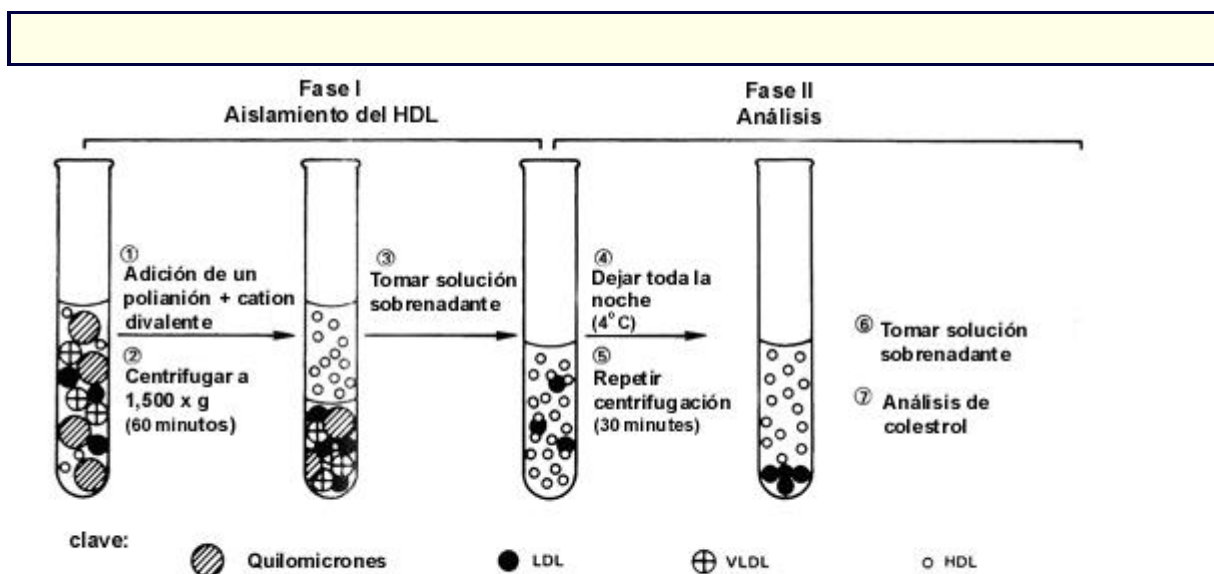


Figura 33-16 Esquema del método de precipitación con polianión (heparina – $MnCl_2$) para la determinación de HDL colesterol.

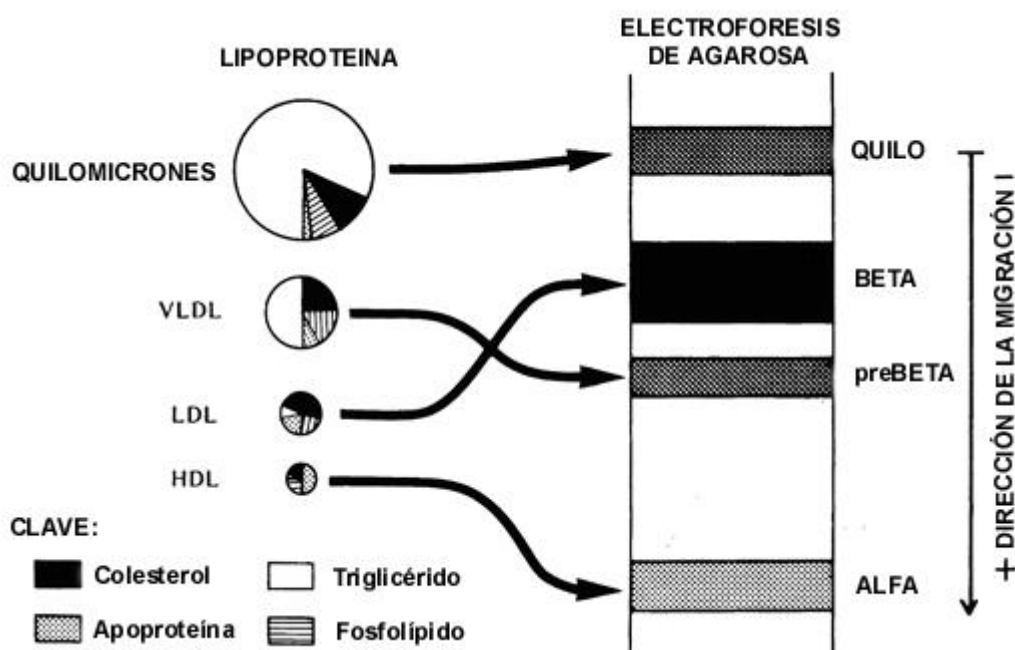


Figura 33-17 Esquema de un modelo electroforético de lipoproteína en agarosa como medio de soporte. HDL, lipoproteína de alta-densidad; LDL, lipoproteína de baja-densidad; VLDL, lipoproteína de muy-baja-densidad.

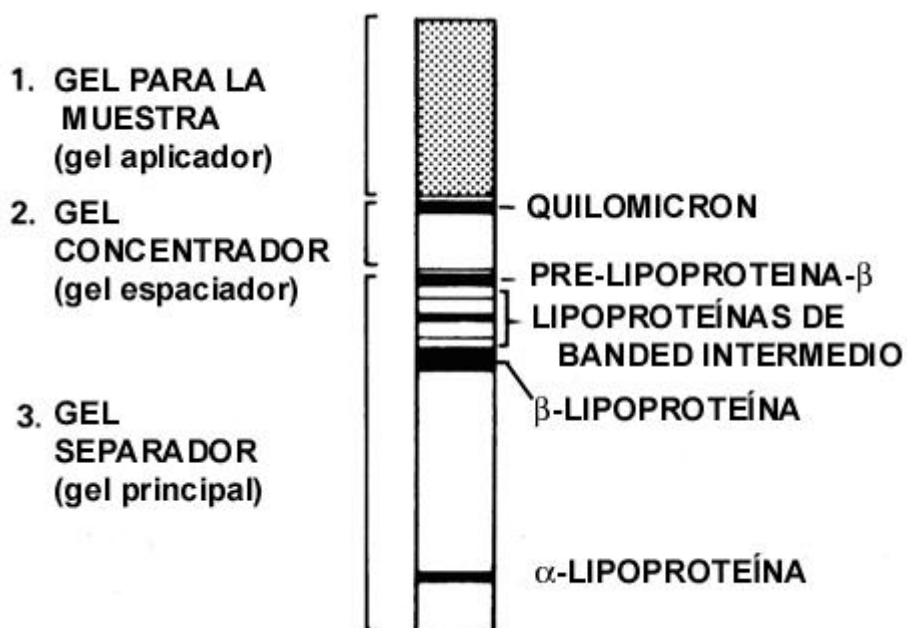


Figura 33-18 Esquema de un modelo electroforético de lipoproteína sobre un medio soporte de gel de poliacrilamida.

CAPÍTULO 34

34. Alcoholismo

Charles L. Mendenhall

Robert E. Weesner

Diagnóstico de alcoholismo

Intoxicación alcohólica

Alcoholismo

Alteraciones bioquímicas y metabólicas

Metabolismo del etanol

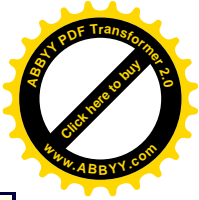
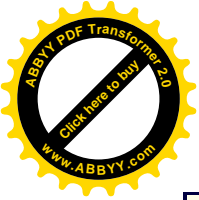
Alteraciones bioquímicas en lípidos, proteínas y carbohidratos

Alteraciones nutricionales asociadas a alcoholismo y a enfermedad hepática provocada por alcohol

Malnutrición proteico-calórica

Anormalidades en vitaminas

Anormalidades en minerales



Patología: enfermedades sistémicas del alcohólico

Mecanismos de daño en órganos

Hígado

Páncreas

Síndrome fetal por alcohol

Complicaciones sistémicas menos comunes

Patología: trauma y abuso de alcohol

Cambio del compuesto analizado en la enfermedad

Enzimas

Bilirrubina

Proteínas

Lípidos

Carbohidratos

Pruebas de función hepática

Excreción de verde de Indocianina

Métodos de análisis

Alcohol

OBJETIVOS

- ♦ Describir el metabolismo del etanol y las alteraciones de la bioquímica de lípidos, proteínas y carbohidratos que resultan del consumo excesivo de alcohol.
- ♦ Citar y describir las alteraciones nutricionales asociadas al alcoholismo y a la enfermedad hepática alcohólica.
- ♦ Describir las enfermedades sistémicas asociadas con el alcoholismo.
- ♦ Enunciar los cambios esperados en los niveles séricos de los siguientes parámetros de laboratorio en la enfermedad hepática provocada por alcohol: aspartato aminotransferasa, alanino aminotransferasa, gama-glutamilttransferasa, lactato deshidrogenasa, fosfatasa alcalina, 5'nucleotidasa, bilirrubina, albúmina, globulinas, colesterol, triglicéridos, ácidos biliares y glucosa.

Términos Clave

cetoacidosis alcohólica Disminución del pH sanguíneo (acidosis) que a veces se observa en alcohólicos, y que está asociada a un aumento de los cuerpos cetónicos en suero (acetona, ácido beta-hidroxibutírico y ácido acetoacético).



cirrosis alcohólica Proceso patológico que resulta del consumo crónico y excesivo de alcohol. Ocurre en hígado, donde la lesión progresiva produce bandas fibróticas o tejido cicatricial que atrapa células hepáticas y desemboca en la pérdida de la arquitectura lobular microscópica (regeneración nodular), normal.

cuerpos de Mallory (hialina alcohólica) Inclusión eosinofílica citoplasmática que se acumula en las células hepáticas. Es típica de la lesión hepática aguda provocada por alcohol hepatitis alcohólica), aunque no siempre está asociada a la misma.

fibrosis hepática Depósito de colágeno y tejido fibroso en hígado, antes del desarrollo de la regeneración nodular y la cirrosis.

hemocromatosis Alteración en el metabolismo del hierro caracterizado por un excesivo depósito de hierro en tejido, particularmente en hígado, páncreas y corazón, que provoca lesiones en el órgano y que puede manifestarse como cirrosis, diabetes mellitus e insuficiencia cardíaca, respectivamente.

hepatitis alcohólica Daño en hígado, agudo y tóxico, asociado con el consumo excesivo de alcohol, y caracterizado por necrosis, inflamación polimorfonuclear y en muchos casos, cuerpos de Mallory.

hígado graso Excesiva acumulación de grasas, fundamentalmente lípidos neutros, triglicéridos y colesterol, en las células del parénquima hepático. El hígado graso se desarrolla en forma predecible tras de la exposición a una variedad de hepatotoxinas, de las cuales el etanol o alcohol etílico es la más común. síndrome fetal por alcohol: grupo de anomalías fetales que resultan del consumo de alcohol por parte de la madre durante la gestación.

kwashiorkor Enfermedad nutricional resultante de la carencia de proteínas, caracterizada por privación de proteínas y disfunción inmunológica. El consumo de calorías totales puede ser deficiente, adecuado o incluso excesivo.

marasmo Enfermedad nutricional resultante de la disminución de calorías, caracterizada por pérdida de peso, pérdida de masa muscular y agotamiento de los depósitos grasos.

síndrome de retirada por alcohol Conjunto de síntomas clínicos asociados con la interrupción del consumo de alcohol, que pueden llegar a incluir temblor, alucinaciones, disfunciones del sistema nervioso autónomo y convulsiones.

síndrome de Wernicke-Korsakoff Enfermedad del sistema nervioso central que aparece en alcohólicos y es atribuida a una deficiencia de tiamina. La encefalopatía de Wernicke consiste en perturbaciones oculares, ataxia, y deterioro de las funciones mentales. Si no se trata terapéuticamente, puede convertirse en el síndrome de Korsakoff, que incluye disminución de memoria, fabulaciones y trastornos en la percepción del tiempo.

El alcoholismo representa uno de los más serios problemas mundiales no sólo a nivel de la salud, sino también desde el punto de vista socio económico. En los Estados Unidos, las enfermedades hepáticas relacionadas con el alcohol constituyen la sexta causa principal de

muerte.^{ref(1249)} Se define al alcohólico como una persona que consume una determinada cantidad de etanol (alcohol etílico) capaz de provocar cambios patológicos.^{ref(1250)} La cantidad de etanol necesaria para provocar la enfermedad depende de una variedad de factores, entre ellos, predisposición genética,^{ref(1251)} malnutrición,^{ref(1252)} e infección viral concomitante en hígado hepatitis viral).^{ref(1253)} Para una persona predispuesta, la cantidad puede llegar a ser tan baja como 35 g/día,^{ref(1254)} que es equivalente al consumo diario de tres bebidas hechas a base de whisky. Sin embargo, para la mayoría de las personas, la cantidad de alcohol necesaria para provocar enfermedad es más de 80 g/día durante por lo menos 10 a 15 años. Esta cantidad equivale al siguiente consumo diario de bebidas acohólicas: 8 cervezas de 12 onzas (6 % alcohol por volumen), 1 litro de vino (12 % alcohol por volumen) o aproximadamente 250 mL de whisky (casi 40 % alcohol por volumen). Debe recalcar que aquellas personas predispuestas pueden desarrollar la enfermedad con cantidades mucho menores de etanol. Sin embargo, cuando el nivel de etanol es inferior a 7 g/día, la condición patológica no aparece, ni siquiera en personas predispuestas.^{ref(1255)} Ver el Capítulo 52 para profundizar sobre el problema de la adicción en general.

Diagnóstico de Alcoholismo

Intoxicación alcohólica

Un elevado nivel de alcohol en sangre demuestra ingestión reciente de alcohol e intoxicación. No puede utilizarse como diagnóstico de alcoholismo, a pesar de que el nivel sanguíneo se correlaciona con signos corrientes de deterioro mental y físico provocados por la intoxicación con etanol. Los signos generales de la intoxicación con etanol son en el cuadro siguiente.

Signos Generales de la Intoxicación con Etanol
Historia de consumo de alcohol Aliento alcohólico en la respiración Nistagmo (rápido movimiento horizontal del ojo) Lenguaje entrecortado Respuesta disminuida al dolor Pobre coordinación motora Nivel de conciencia disminuido.

La relación entre los niveles de alcohol en sangre y los signos físicos de intoxicación en un bebedor esporádico ha sido bien establecida y figura en la Tabla 34-1. La función motora disminuida asociada a niveles sanguíneos elevados puede llevar al trauma a la persona intoxicada. A niveles sanguíneos de alcohol entre 400 y 600 mg/L, existe un significativo deterioro en las funciones de manejo de vehículos, incluyendo las habilidades motoras, cognitivas y de procesamiento de información.^{ref(1256)} Los conductores con niveles sanguíneos entre 500 y 900 mg/L, tienen nueve veces más probabilidad de involucrarse en un accidente de coche que los individuos con valores no detectables de alcohol en sangre.^{ref(1257)}



Para aquellos consumidores crónicos de alcohol, los mismos signos y síntomas pueden observarse a niveles sanguíneos aún mayores, inclusive a valores de alcohol tan elevados como 1000 mg/L o más. Antecedentes de una intoxicación alcohólica pueden llevar al médico a la sospecha de alcoholismo crónico.

Alcoholismo

Una característica de los alcohólicos es intentar ocultar o disimular su exceso en las bebidas, y por ello, su propia historia de consumo puede no ser veraz. Frecuentemente se requiere la confirmación por parte del cónyuge o de familiares directos para determinar con exactitud si existen antecedentes de consumo de bebidas alcohólicas. Sin embargo, los signos y síntomas de la intoxicación corriente enunciados anteriormente, sumados a los síntomas del retiro de la droga (para los alcohólicos, el *delirium tremens*), llevan a sospechar un abuso crónico de alcohol.

Se han propuesto diferentes marcadores de laboratorio como herramientas de diagnóstico para confirmar el consumo excesivo de etanol.[ref\(1258\)](#) Una cantidad tan pequeña como dos bebidas diarias, puede provocar un aumento significativo del volumen corpuscular medio (VCM) de los glóbulos rojos.[ref\(1259\)](#) Sin embargo, en general no hay grandes cambios, y puede ser necesario utilizar los valores basales previos al consumo de bebida para reconocer el efecto del etanol.

Se ha demostrado que la gama-glutamyltransferasa (GGT) sérica es fácilmente modificada por una variedad de compuestos, incluyendo el etanol. En ausencia de otros parámetros de laboratorio anormales para enfermedad hepática, niveles elevados de GGT pueden ser útiles para reconocer al bebedor crónico en el estadio previo a la enfermedad.

Alteraciones Bioquímicas y Metabólicas

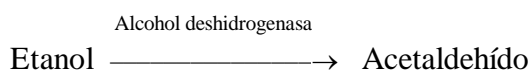
Metabolismo del etanol

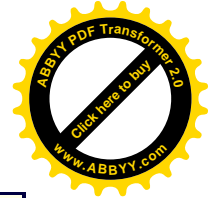
En los seres humanos, el etanol es primariamente un compuesto exógeno que se incorpora al organismo mediante el consumo de bebidas alcohólicas, y que es fácilmente absorbido al través de todo el tracto gastrointestinal. El etanol sanguíneo es metabolizado por el hígado a una velocidad constante, disminuyendo 150-200 mg/L por hora en un individuo normal, y alcanzando 300-400 mg/L por hora en un alcohólico crónico. Esto implica una velocidad de depuración de aproximadamente 3 onzas de etanol por hora para un adulto promedio.

La mayor parte del etanol absorbido se degrada por procesos oxidativos que ocurren fundamentalmente en hígado, primero a acetaldehído y posteriormente a acetato. Solamente del 2% al 10% se excreta sin oxidar por orina y pulmones. Existen al menos tres sistemas enzimáticos capaces de producir la oxidación del etanol:

(1) alcohol deshidrogenasa. (2) sistema microsomal oxidante de etanol (MEOS: microsomal ethanol oxidizing system, el acrónimo más usado), y (3) catalasa.

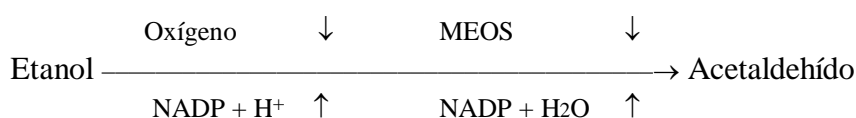
El principal camino metabólico de oxidación del etanol involucra a la alcohol deshidrogenasa (ADH), lo cual es especialmente cierto en la intoxicación aguda:





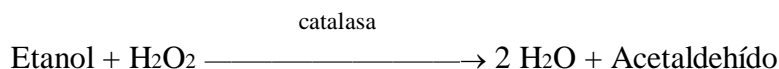
El paso inicial catalizado por la alcohol deshidrogenasa parece ser el limitante para la depuración del etanol de la sangre, pero no es específico para el mismo. Metanol, retinol (vitamina A), y otros alcoholes también son oxidados por esta enzima. Este hecho es importante desde el punto de vista clínico para el tratamiento de la intoxicación aguda con metanol.[ref\(1260\)](#) En este caso, se administra en forma terapéutica etanol para que compita con el metanol por los sitios de unión de la enzima ADH, postergando así la oxidación de metanol a su metabolito tóxico formaldehído.

MEOS es el sistema enzimático secundario para la depuración de etanol:



Esta enzima microsomal se encuentra en el retículo liso del endoplasma de los hepatocitos. En el alcohólico crónico existe un aumento de actividad de MEOS.[ref\(1261\)](#) La inducción de su actividad está asociada a la actividad aumentada de otros constituyentes del retículo liso involucrados en el metabolismo de drogas, como GGT, 5'Nucleotidasa, citocromo P-450 reductasa y citocromo p-450. Estos cambios son significativos desde el punto de vista clínico, pues transforman al alcohólico en un individuo más resistente a los efectos de los sedantes y barbitúricos más comunes, por lo que resulta necesario administrar dosis mayores que las habituales cuando se requiere lograr la sedación. Cuando se consumen simultáneamente etanol y barbituratos, la inhibición enzimática por competición provoca una depuración disminuida[ref\(1262\)](#) y se alcanzan niveles anormalmente elevados de barbituratos en sangre. Esta interacción puede inclusive llevar a la muerte.

El papel de la catalasa en la oxidación biológica del etanol está en discusión.[ref\(1263\)](#) Se ha demostrado in vitro que en presencia de un sistema generador de peróxido (H_2O_2), la catalasa es capaz de oxidar al etanol según la siguiente reacción:



Parece que la baja velocidad mediante la cual el peróxido puede ser generado a partir de NADPH oxidasa o xantino oxidasa, es la razón por la cual la catalasa contribuye con no más de 2% en la oxidación in vivo del etanol.

Alteraciones bioquímicas en lípidos, proteínas y carbohidratos

Lípidos.

Los lípidos se acumulan en la mayoría de los tejidos en los cuales el etanol es metabolizado, provocando hígado graso, miocardio graso, túbulos renales grasos, y así sucesivamente.[ref\(1264\)](#) El mecanismo parece ser multifactorial, resultante de la acumulación aumentada de lípidos y de la oxidación disminuida de los mismos.[ref\(1265\)](#) Aunque la secreción de lipoproteínas séricas



es baja en comparación a la carga lipídica que se acumula en hígado, la cantidad total secretada está aumentada por encima de la normal, y esto puede desembocar en una hiperlipidemia alcohólica.^{ref(1266)} Esta hiperlipidemia de tipo IV presenta niveles séricos elevados de triglicéridos y ésteres del colesterol, provocando un aumento en suero de lipoproteínas hepáticas de muy baja densidad y de partículas similares a quilomicrones.

Las actividades enzimáticas relacionadas con la oxidación del etanol y con el metabolismo de drogas están frecuentemente alteradas. Estos cambios pueden ser producidos en forma directa, por inducción o por supresión enzimática, o en forma indirecta, por el cambio de equivalentes de reducción, o sea, por el aumento de la relación NADH/NAD^+ .

Proteínas.

Proteínas puede estar alterada su liberación por parte de las células hepáticas que las sintetizaron. Como consecuencia de ello, la acumulación de proteínas es uno de los cambios que más precozmente se observan en el hígado del alcohólico.^{ref(1267)} Ocurre simultáneamente con la acumulación grasa, y contribuye a aumentar el tamaño del hígado (hepatomegalia), condición que se observa en más del 90 % de los alcohólicos con enfermedad hepática.^{ref(1268)}

Carbohidratos.

Carbohidratos a través de diferentes mecanismos, el etanol actúa deteriorando la gluconeogénesis. Este es un proceso mediante el cual la glucosa se obtiene a partir de compuestos que no son carbohidratos, por ejemplo, glicerol, piruvato y algunos aminoácidos. Debido a que el etanol promueve la formación de lípidos que contienen glicerol, y además altera el transporte de aminoácidos, disminuye la disponibilidad de estos compuestos para la gluconeogénesis. La actividad de la ácido glutámico deshidrogenasa, que está disminuida debido a los niveles elevados de NADH, disminuye la disponibilidad del alfa-cetoglutarato necesario para la transaminación de los aminoácidos antes de su conversión a glucosa. Esto último también contribuye a alterar el proceso de gluconeogénesis.

El aumento de NADH junto con el descenso concomitante de NAD^+ asociado a la actividad de ADH puede también provocar cambios secuenciales en el metabolismo de carbohidratos con consecuencias clínicas. La disponibilidad aumentada de NADH provoca un aumento en la producción de lactato, que disminuye su disponibilidad para la gluconeogénesis y puede provocar hiperlacticoacidemia.^{ref(1269)} Esta condición reduce la capacidad del riñón para excretar ácido úrico, originando una hiperuricemia secundaria,^{ref(1270)} que en personas predispuestas puede agravarse o precipitar ataques de gota.^{ref(1271)}

El almacenamiento de glucógeno en hígado también está disminuido en alcohólicos, debido a una pobre ingesta en la dieta y a las enfermedades hepáticas frecuentemente asociadas al alcoholismo crónico (hígado graso, hepatitis alcohólica y cirrosis alcohólica). Las consecuencias clínicas que implican estos cambios en el glucógeno hepático y en el alterado proceso de gluconeogénesis se estudian más adelante, junto con la intervención de la insulina y otras hormonas en el desarrollo de la hipoglucemia alcohólica.

En ausencia de enfermedad hepática, malnutrición u otras condiciones predisponentes, el etanol por sí mismo solo produce un ligero aumento de la glucosa sanguínea, pudiendo incluso no provocar ningún cambio. Si éste se produce, el pico de glucosa aparece 30 a 45 minutos después de la ingestión, y representa un aumento que generalmente no supera el 7% - 10 %.



Alteraciones Nutricionales Asociadas con Alcohologismo y Enfermedad Hepática Alcohólica

Malnutrición proteíno-calórica

Las bebidas alcohólicas tienen un contenido alto en calorías. Cada gramo de etanol produce 7 kcal. El etanol puede ser el responsable de hasta el 10% de la ingesta energética total de un consumidor moderado y de hasta el 50% en un alcohólico. Sin embargo, las bebidas alcohólicas tienen escaso valor nutritivo,^{ref(1272)} y el alcohologismo crónico siempre se ha asociado a malnutrición y enfermedad hepática. La malnutrición, en forma de una deficiencia proteíno-calórica, proviene de una variedad de causas: (1) pobre ingesta en la dieta; (2) mala absorción de los nutrientes consumidos como resultado de gastritis inducida por alcohol, pancreatitis o diarrea; y (3) alteraciones en procesos bioquímicos y fisiológicos.

La malnutrición proteíno-calórica (MPC), ha sido clasificada como marasmo, si predomina una deficiencia calórica, y como enfermedad semejante al kwashiorkor, si predomina una deficiencia proteica.^{ref(1273)} (ver capítulo 37) En un estudio realizado en 284 alcohólicos con hepatitis alcohólica, todos los pacientes tenían algún grado de M.P.C., y 80 % presentaba signos de marasmo y enfermedad semejante a kwashiorkor.^{ref(1274)} La determinación de los niveles de prealbúmina en suero puede utilizarse para el diagnóstico y seguimiento de la MPC.^{ref(1275)}

Aunque la lesión hepática puede aparecer en ausencia de malnutrición, sus formas más severas están invariablemente asociadas a una severa malnutrición. El reconocimiento de las deficiencias nutricionales es importante para el paciente alcohólico con enfermedad hepática porque la corrección de esas anomalías mediante una adecuada terapia nutricional puede acelerar la recuperación del daño hepático y aumentar el grado de supervivencia.

Anormalidades en vitaminas

El consumo excesivo de alcohol conduce normalmente a una deficiencia de vitaminas,^{ref(1276)} resultante de la pobre nutrición general asociada al abuso de alcohol y al daño hepático. El hígado no solamente constituye un importante depósito de vitaminas, sino también es el lugar donde se produce su conversión a compuestos útiles desde el punto de vista metabólico (ver capítulo 39). Por ello, la lesión hepática altera el metabolismo de las vitaminas. Estas pueden ser liberadas por las células hepáticas necrosadas que se pierden en el organismo y que no son apropiadamente reemplazadas.^{ref(1277)} Además, las vitaminas liposolubles (vitaminas A, D, K y E) pueden no ser absorbidas en forma adecuada por el intestino de los alcohólicos.^{ref(1278)}

Debido a la mayor síntesis de ácidos nucleicos y a la regeneración hepática, el alcohol puede aumentar el requerimiento por parte del organismo de ácido fólico y de vitaminas B₁₂ y B₆.^{ref(1279)} La reposición de vitaminas y proteínas es importante en el tratamiento del paciente alcohólico, dadas las interacciones entre hígado, alcohol y vitaminas. En la Tabla 34-2 se observa la incidencia de la disminución de los valores séricos de vitaminas en pacientes con cirrosis alcohólica. (Ver capítulo 39 para bioquímica y fisiología de vitaminas).

Vitamina A.

Vitamina A se absorbe como retinol, que para ser funcional, debe ser oxidado a retinal con la ayuda de la alcohol deshidrogenasa. El alcohol inhibe competitivamente la conversión



de retinol a retinal en el hígado.[ref\(1280\)](#)

Vitamina B₁ (tiamina).

El deficiencia de tiamina aparece frecuentemente en alcohólicos.[ref\(1281\)](#) El requerimiento de tiamina es mayor cuando los carbohidratos constituyen la mayor fuente de energía, como ocurre a veces en los alcohólicos. En algunos pacientes, la deficiencia de tiamina puede producir un desorden neuropsiquiátrico, que puede ser genéticamente determinado,[ref\(1282\)](#) llamado *síndrome de Wernicke-Korsakoff*. Existen evidencias crecientes que hacen suponer que la deficiencia de tiamina también contribuye a otras formas de lesión cerebral en alcohólicos.[ref\(1283\)](#)

Vitamina B₂ (riboflavina).

Rara vez es un problema en el alcohólico.[ref\(1284\)](#)

Acido nicotínico.

Su deficiencia severa provoca la pelagra que se observa en alcohólicos.[ref\(1285\)](#)

Vitamina B₆ (piridoxina).

En la hepatitis alcohólica el nivel sérico de la aspartato aminotransferasa (ASAT o TGO) es mayor que el de la alanino aminotransferasa (ALAT o TGP) en el 90 % de los pacientes.[ref\(1286\)](#)

Acido fólico.

La deficiencia de acido fólico deficiencia vitamínica más común entre los alcohólicos.[ref\(1287\)](#) La deficiencia de folato contribuye a la anemia megaloblástica que se observa en ellos.[ref\(1288\)](#) El alcohol no inhibe la absorción intestinal del folato asociado a los alimentos.[ref\(1289\)](#) Se cree que las mayores causas que explican su deficiencia en alcohólicos son la pobre ingesta en la dieta y el aumento, tanto de los requerimientos como de la excreción.[ref\(1290\)](#) Además, el alcohol puede bloquear directamente el metabolismo de folato.[ref\(1291\)](#)

Vitamina B₁₂ (cianocobalamina).

Su deficiencia raramente es un problema,[ref\(1292\)](#) aunque en algunos individuos el alcohol inhibe su absorción a nivel del ileum.[ref\(1293\)](#) Debido a que la vitamina B₁₂ se almacena en hígado, la necrosis aguda de la célula hepática durante la hepatitis alcohólica puede provocar un significativo aumento en los niveles séricos de B₁₂, que cursa en forma paralela a la severidad de la lesión hepática.

Vitamina C (ácido ascórbico).

El deficiencia de vitamina C no es común en alcohólicos; los niveles bajos presentes se atribuyen a una pobre ingesta en la dieta.[ref\(1294\)](#)

Vitamina D.

El deficiencia de vitamina D no es un grave problema entre los alcohólicos.[ref\(1295\)](#)



Vitamina E.

Los alcohólicos crónicos son susceptibles a su deficiencia, debido a una pobre ingesta en la dieta y al estado de malnutrición general. Se sabe que la deficiencia pura de vitamina E produce lesión testicular, pero no está claro aún si esto contribuye a explicar el hipogonadismo alcohólico.[ref\(1296\)](#)

Vitamina K.

Dado que los depósitos de esta vitamina son pequeños, la obstrucción biliar o la enfermedad severa del parénquima hepático pueden provocar trastornos en la coagulación.[ref\(1297\)](#) Los alcohólicos frecuentemente presentan un tiempo de protrombina prolongado.[ref\(1298\)](#) Cuando a estos pacientes se les administra vitamina K por vía parenteral, algunos muestran una corrección en el tiempo de protrombina, lo que indica una deficiencia de vitamina K. Aquellos que no mejoran con vitamina K tienen una enfermedad hepática demasiado severa como para utilizar la vitamina.[ref\(1299\)](#)

Anormalidades en minerales (ver Capítulos 35 y 37)

Hierro.

Todavía no está claramente desentrañado el mecanismo responsable de la ligera a moderada acumulación de hierro en el hígado de algunos pacientes con enfermedad alcohólica hepática. Algunas bebidas alcohólicas, especialmente los vinos tintos, contienen hierro. La preparación de cerveza en ollas de hierro ha sido la causa de la hemocromatosis en la población Bantú de Sudáfrica.[ref\(1300\)](#) El efecto del alcohol sobre el folato puede influenciar la absorción del hierro. La deficiencia de folato está asociada con una eritropoyesis (producción de glóbulos rojos) ineficaz y con una sobrecarga de hierro.[ref\(1301\)](#) Los alcohólicos con una significativa sobrecarga de hierro pueden, de hecho, poseer el gen para la hemocromatosis idiopática primaria.[ref\(1302\)](#) Algunos alcohólicos tienen niveles bajos de hierro debido a pobre ingesta en la dieta, pérdida crónica de sangre por el tracto intestinal (gastritis, úlcera péptica, varices esofágicas y gástricas) y trastornos en la coagulación.[ref\(1303\)](#)

Zinc.

Zinc, un elemento micronutriente esencial, es importante para la síntesis de RNA y DNA, y para una variedad de enzimas zinc-dependientes, incluyendo la alcohol deshidrogenasa.[ref\(1304\)](#) La deficiencia de zinc también altera el metabolismo de la vitamina A.[ref\(1305\)](#) Los alcohólicos pueden tener niveles disminuidos de zinc debido a una reducida ingesta oral y a un aumento de su excreción urinaria, y pueden presentar algunos síntomas característicos de los estados de deficiencia de zinc.[ref\(1306\)](#) Estudios futuros serán necesarios para definir el rol del zinc en el hipogonadismo asociado al alcohol y otros problemas relacionados.[ref\(1307\)](#)

Plomo.

Algunos vinos tienen un alto contenido de plomo.[ref\(1308\)](#) Además, la intoxicación por plomo puede ocurrir en la producción ilegal de whisky u otras bebidas alcohólicas, cuando se emplean alambiques caseros contruidos con elementos que tengan plomo, como radiadores viejos o tuberías.[ref\(1309\)](#) Por ello, y debido a su alto riesgo, es necesario detectar en alcohólicos cualquier signo o síntoma de intoxicación por plomo (ver capítulo 38).

Calcio (ver capítulo 28).

Los pacientes con enfermedad hepática alcohólica pueden tener niveles bajos de calcio. Se ha encontrado que el alcohol aumenta la excreción de calcio.[ref\(1310\)](#) Los pacientes con cirrosis tienen una absorción disminuida de calcio, que puede ser el resultado de una disminución en la hidroxilación de la vitamina D en hígado.[ref\(1311\)](#) Si el paciente presenta una mala absorción de grasas, éstas pueden formar con el calcio jabones insolubles en el lumen intestinal, impidiendo así su absorción.

Magnesio.

Los alcohólicos crónicos comúnmente tienen una deficiencia de magnesio, como resultado de una pobre ingesta en la dieta, cetosis por inanición, vómitos, y aumento de la excreción urinaria lo cual es un efecto directo del alcohol. También es bajo el nivel de magnesio durante el síndrome de remoción de alcohol, lo que puede contribuir a explicar los signos y síntomas de esta alteración.[ref\(1312\)](#)

Fósforo.

Aproximadamente el 50 % de los alcohólicos hospitalizados presentan hipofosfatemia.[ref\(1313\)](#) Después de una ingestión de carbohidratos, el fósforo sérico disminuye de 10 a 15 mg/L. Los alcohólicos alcanzan su nivel más bajo de fósforo entre el segundo y cuarto día de hospitalización.[ref\(1314\)](#) Los bajos niveles observados en alcohólicos pueden ser resultado del efecto del alcohol por sí mismo, y también de una pobre ingesta de alimentos, diarrea, vómitos, deficiencia de magnesio, o el uso de antiácidos conteniendo aluminio.

Patología: Enfermedades Sistémicas del Alcohólico

Mecanismos de daño en órganos

El etanol es una toxina sistémica directa que provoca daño en todos los tejidos, dependiendo de la dosis y de la duración de la exposición. El grado de lesión varía entre los distintos sistemas de órganos. El hígado, órgano predominantemente responsable del metabolismo del etanol, presenta la incidencia más alta en cuanto a la severidad del daño ocasionado.

El acetaldehído es el producto de las tres vías de oxidación del etanol descritos anteriormente. Varios desórdenes orgánicos y alteraciones bioquímicas parecen ser inducidas por el etanol o por el acetaldehído, pero no necesariamente por ambos. Por ejemplo, el síndrome fetal por alcohol parece obedecer a un efecto del etanol independientemente del acetaldehído,[ref\(1315\)](#) mientras que la fibrosis hepática y la formación de colágeno estarían más asociadas con el acetaldehído que con el etanol. El acetaldehído fácilmente forma aductos con los componentes de la membrana celular, que pueden causar daño celular en forma directa o pueden crear nuevos estimulantes antigénicos. El daño tisular, especialmente en hígado, puede ser de naturaleza inmunológica.[ref\(1316\)](#)

Hígado

Aparecen tres tipos de condiciones patológicas en hígado que forman un espectro que va desde muy ligeros cambios reversibles hasta la enfermedad irreversible que puede provocar la muerte.^{21ª} Las interrelaciones existentes entre estos cambios se observan en la Fig. 34-1.

Hígado graso.

La forma más leve de lesión hepática se caracteriza por infiltración grasa (hígado graso alcohólico) y por un mínimo grado de inflamación y necrosis. En casos más severos de hígado graso, puede aparecer fibrosis, especialmente alrededor de los canales venosos centrales. Clínicamente, esto se manifiesta por agrandamiento del hígado (hepatomegalia), sensibilidad sobre el órgano y anorexia. Los cambios en los parámetros de laboratorio son mínimos, ligera elevación de los niveles de GOT, bilirrubina y fosfatasa alcalina. Si se dispone de ellos, los parámetros más fiables para detectar los estadios tempranos de la enfermedad son la determinación de ácidos biliares en suero, y la prueba de verde de indocianina. El hígado graso alcohólico se considera habitualmente como una enfermedad benigna y reversible. Sin embargo, se ha observado muerte súbita en un pequeño porcentaje de pacientes, presumiblemente por embolia grasa.

Hepatitis alcohólica.

Es la forma más severa de lesión hepatotóxica, también caracterizada por hígado graso y hepatomegalia. Además, la inflamación y la necrosis están más extendidas, y la fibrosis es un rasgo destacable. Durante las primeras 6 semanas tras el ingreso hospitalario, el índice de mortalidad para la hepatitis aguda alcohólica alcanza el 60%.

La hepatitis alcohólica es frecuentemente un estadio crucial hacia la progresión de la enfermedad cirrótica. En un estudio¹⁸ realizado en pacientes con hepatitis alcohólica clínica, la enfermedad derivó en cirrosis en el 54.7% de 97 pacientes en los que se pudo obtener una muestra histológica. En un alto porcentaje (76.2%) de pacientes pudo observarse el contorno irregular de una red homogénea de material eosinófilo en el citoplasma de la célula hepática (cuerpos de Mallory o hialina alcohólica). Su presencia no es diagnóstica de hepatitis alcohólica porque también aparecen en otras patologías hepáticas. Sin embargo, en un alcohólico con enfermedad hepática, su presencia si la sugiere. Se cree que la hialina alcohólica proviene de la degeneración de microfilamentos que luego actúan como irritantes inmunológicos y estimulan la fibrosis.[ref\(1317\)](#)

Las manifestaciones clínicas de la hepatitis alcohólica, y así mismo los parámetros de laboratorio involucrados, se observan en la Tabla 34-3. Ninguno de los síntomas o cambios son patognomónicos de esta condición patológica.

A medida que la enfermedad progresa, todos los parámetros de laboratorio habituales para daño hepático se vuelven anormales en distinto grado. Especialmente notables son las variaciones en los valores de las enzimas séricas. Aunque el nivel de la GOT está elevado en más del 75%, aún de los casos más suaves, la magnitud de su aumento raramente sobrepasa diez veces el límite superior normal. El valor promedio observado es 84 ± 6 mU/mL. De forma similar, el nivel de la GPT está solo ligeramente elevado; habitualmente es menor que 100 mU/mL e invariablemente casi siempre es menor que el de la GOT. Cuando los valores de GPT se aproximan a 200 mU/mL o son mayores que los de GOT, esto indica una hepatitis crónica persistente, o una hepatitis agresiva crónica, en lugar de una hepatitis alcohólica sin complicaciones. En estas circunstancias, solamente una biopsia puede diferenciar la causa de la enfermedad hepática.

Aunque la confirmación histológica de la hepatitis es el mejor indicador pronóstico, la bilirrubina sérica y el tiempo de protrombina son los parámetros de laboratorio que permiten predecir de forma segura la severidad y el pronóstico de la enfermedad hepática. Sin

embargo, no son lo suficientemente sensibles para diagnosticar formas más suaves de la enfermedad, (inclusive en estos casos pueden ser normales), pero a medida que la enfermedad progresa, aumenta su utilidad clínica. Cuando el nivel de bilirrubina es mayor de 200 mg/L y cuando el tiempo de protrombina se prolonga más de cuatro segundos, el paciente está en una condición de alto riesgo. En este grupo, la mortalidad sobrepasa el 75%.

Los resultados obtenidos para ambos parámetros permiten clasificar a la enfermedad como leve, moderada o severa.^{ref(1318)} La primera se presenta cuando la bilirrubina es menor de 50 mg/L con un tiempo de protrombina normal o ligeramente aumentado. La enfermedad moderada se presenta cuando la bilirrubina es igual o mayor de 50 mg/L y el tiempo de protrombina es normal o moderadamente elevado (prolongación no superior a cuatro segundos). La enfermedad severa se presenta con niveles de bilirrubina que sobrepasan los 50 mg/L y tiempos de protrombina prolongados en más de cuatro segundos. A medida que la severidad aumenta, la incidencia de ascitis y encefalopatía también se incrementa, mientras que la supervivencia a un año disminuye progresivamente de 91% a 46% (ver Tabla 34-3).

Cirrosis.

El estadio final de la enfermedad hepática alcohólica crónica es el desarrollo de cirrosis con fibrosis hepática extendida, regeneración nodular, distorsión de la arquitectura del hígado, y finalmente, todas las complicaciones clínicas de la enfermedad hepática crónica, insuficiencia hepática, y muerte. En algunos casos, la cirrosis puede ser difícil de diagnosticar clínicamente, especialmente cuando también están presentes una hepatitis alcohólica activa con necrosis aguda e inflamación. Un diagnóstico exacto de cirrosis sólo se obtiene realizando una biopsia hepática.

Páncreas

La asociación entre alcohol y pancreatitis es, como mínimo, tan estrecha como la relación entre alcohol y enfermedad hepática. En examen post-mortem, 18% a 47% de los alcohólicos que murieron por causas distintas a pancreatitis, tenían alguna evidencia histológica de pancreatitis.^{ref(1319)} El alcohol es responsable de al menos 30%, según algunos estudios 60% a 90%, de los casos de pancreatitis en Estados Unidos.^{ref(1320)} Aunque existe un amplio rango de variación individual, la duración media de consumo de alcohol previo al diagnóstico inicial de pancreatitis es 18 años para hombres y 11 años para mujeres. Esta diferencia indica que las mujeres tienen mayor predisposición. El riesgo de desarrollar pancreatitis se duplica por cada 50 g de incremento en el consumo diario de alcohol.^{ref(1321)}

El alcohol estimula la secreción gástrica de ácido, que cuando entra en contacto con la mucosa duodenal, estimula a su vez la secreción de jugo pancreático.^{ref(1322)} En el proceso inicial de la enfermedad, este jugo pancreático inducido por el alcohol tiene una alta concentración de proteínas, que precipitan y forman tapones dentro de los conductos pancreáticos, provocando subsecuentemente su obstrucción. Esto provoca dilatación y proliferación de los conductos, dilatación del tejido acinar y finalmente, esclerosis de los conductos. Con el tiempo, los tapones de proteínas pueden calcificarse, apareciendo así una imagen radiográfica de pancreatitis calcificada crónica. A medida que este proceso continúa, la concentración de proteínas o de enzimas en el jugo pancreático va disminuyendo hasta que el nivel de enzimas presentes es insuficiente para la digestión de los alimentos, y aparece la mala absorción.^{refs(1323)} En este proceso crónico, y por causas aún no aclaradas, se superponen



ataques dolorosos de pancreatitis aguda caracterizados por elevación de amilasa y lipasa.

La primera crisis de pancreatitis se produce tras un largo periodo de consumo constante de alcohol, por lo que en la mayoría de los pacientes se desarrolla entre los 30 y 40 años.^{ref(1324)} Una vez que la pancreatitis se ha establecido, un alto porcentaje de aquellos que continúan bebiendo padecen dolor crónico.^{ref(1325)} La insuficiencia pancreática aparece cuando 80% a 90% del órgano se ha destruido, requiriendo entonces una sustitución de enzimas por vía oral.^{ref(1326)} Además de la destrucción de las células secretoras de enzimas, también pueden destruirse las células productoras de insulina y glucagón. Cuando esto ocurre, el alcohólico desarrolla una diabetes mellitus y precisa insulina. Debido a que el nivel de glucagón también está disminuido y es demasiado bajo como para estimular adecuadamente la síntesis de glucosa, estos pacientes son diabéticos frágiles y son propensos a ataques hipoglucémicos.^{ref(1327)} Esto hace más difícil el tratamiento, especialmente si continúa el consumo de alcohol.^{ref(1328)}

Síndrome alcohólico fetal

El alcohol atraviesa fácilmente la placenta y se distribuye por todo el tejido fetal. Está bien demostrado que el etanol es una toxina fetal con características teratogénicas. Por esta razón, el consumo de etanol durante el embarazo está asociado a una variedad de efectos adversos, incluyendo aborto espontáneo, parto prematuro, bajo peso al nacer, muerte en el parto y baja expectativa de vida del neonato, lo que implica retraso en el desarrollo mental y motor, y el *síndrome alcohólico fetal*.

Este último se caracteriza por un perfil de defectos de nacimiento, que incluyen retraso en el crecimiento prenatal y postnatal, anomalías en el rostro, disfunción renal, disfunción a nivel de Sistema Nervioso Central y retraso mental. Se ha estimado que el síndrome fetal por alcohol constituye la principal causa de retraso mental en el mundo occidental.^{ref(1329)}

Complicaciones sistémicas menos frecuentes

Corazón.

Entre los alcohólicos, la incidencia de enfermedad cardíaca clínicamente significativa es mucho menor que la que corresponde a enfermedad hepática o pancreática. Se estima que entre un 20% y un 30% de alcohólicos desarrollan enfermedad hepática. En dos estudios sobre un total de 278 autopsias de pacientes alcohólicos, 11% a 15% presentaban signos de cardiomiopatía alcohólica.^{ref(1330)} La verdadera incidencia de la cardiomiopatía es desconocida. Cuando aparece, el etanol provoca un efecto depresor agudo sobre la función del miocardio^{ref(1331)} con dilatación cardíaca progresiva que terminan produciendo una insuficiencia cardíaca por bajo gasto. Si sobreviene la muerte, ésta ocurre como consecuencia de una importante cardiomegalia y de una insuficiencia cardíaca crónica intratable, complicadas con fenómenos de embolismo.

Sistema nervioso central y periférico.

Las manifestaciones más comunes de una función cerebral alterada en el alcohólico son los síntomas de embriaguez, seguidos en frecuencia por los síntomas del síndrome de abstinencia: temblor, confusión, alucinaciones, delirium tremens y convulsiones. Todos ellos son habitualmente cambios funcionales reversibles. Menos comunes, pero frecuentemente irreversibles son los desórdenes metabólicos asociados con el prolongado y continuo consumo



de bebida y, en muchos casos, las deficiencias nutricionales: síndrome de Wernicke-Korsakoff, neuropatía periférica, ambliopía (pérdida de visión), degeneración cerebelar, degeneración cerebral, mielinolisis central pontina y demencia progresiva con desmielinización del cuerpo calloso (enfermedad de Machiafava-Bignami). Estudios clínicos y estudios realizados en animales indican un deterioro inducido por etanol en la función mnemónica del cerebro.[ref\(1332\)](#) (Ver detalles de los síndromes nombrados en un texto de neurología).

Cáncer.

El cáncer primario de hígado, un tumor raro, se observa en 5% a 10% de los alcohólicos con cirrosis alcohólica.[ref\(1333\)](#) Se cree que está provocado por el mismo proceso cirrótico. Además de los hepatomas asociados a la cirrosis alcohólica, estudios epidemiológicos prospectivos y retrospectivos indican que el consumo crónico de alcohol es por sí mismo un factor de riesgo para el cáncer.[ref\(1334\)](#) Numerosos estudios clínicos realizados en alcohólicos llegaron a la misma conclusión. Los grandes bebedores tienen una mayor incidencia de cáncer de boca, laringe, faringe y esófago.[ref\(1335\)](#) El consumo de alcohol puede también estar relacionado con la incidencia de cáncer de páncreas, cardias y colon.[ref\(1336\)](#) Esta evidencia epidemiológica es más intensa para el caso de cáncer de boca y faringe. Así un bebedor crónico y fumador crónico tiene un riesgo quince veces mayor de desarrollar una patología maligna oral que el no bebedor y no fumador. Al parecer, el riesgo de cáncer asociado a etanol estaría relacionado con el tempo de consumo y la dosis.[ref\(1337\)](#)

Efectos endocrinos.

Varían dependiendo si el consumo de alcohol es agudo o crónico.[ref\(1338\)](#) Un consumo moderado de alcohol tiene escaso efecto en el cortisol a nivel de la glándula adrenal,[ref\(1339\)](#) aunque cuando el nivel sanguíneo de alcohol supera 1 g/L puede provocar un aumento en el nivel plasmático de cortisol. Los alcohólicos crónicos muestran ocasionalmente rasgos clínicos del síndrome de Cushing y niveles elevados de cortisol.[ref\(1340\)](#) La abstinencia provoca el retorno del cortisol a sus valores normales en 2 a 3 semanas.[ref\(1341\)](#)

Algunos alcohólicos muestran evidencia de insuficiencia hipofisaria. Normalmente, bajos niveles sanguíneos de glucosa producen un aumento del cortisol. Esta respuesta está disminuida o ausente en el 25% de los alcohólicos crónicos porque la glándula hipofisaria no secreta suficiente cantidad de hormona adrenocorticotrópica (ACTH) para estimular la glándula adrenal.[ref\(1342\)](#) Otra evidencia de insuficiencia hipofisaria son los niveles bajos de hormona de crecimiento y prolactina después de la estimulación provocada por un bajo nivel de glucosa sanguínea.[ref\(1343\)](#) Se cree que los niveles bajos de testosterona que se observan en alcohólicos también están relacionados a una insuficiencia pituitaria.[ref\(1344\)](#)

Efectos hematopoyéticos.

Los efectos del alcohol sobre la sangre y la médula ósea son el resultado de su acción tóxica directa y de las deficiencias nutricionales asociadas.[ref\(1345\)](#) (ver Capítulos 37 y 39). Los alcohólicos no sólo presentan niveles bajos de folato, sino que el alcohol también inhibe la absorción de la vitamina B₁₂. Cada uno de estos factores por sí mismo, o la combinación de ambos, llevan a la producción de glóbulos rojos anormalmente grandes y a la anemia megaloblástica.[ref\(1346\)](#)

El metabolismo del hierro se ve afectado por el alcohol de diversas maneras. El

alcohol puede producir pérdida crónica de sangre (úlceras, gastritis, sangrado de várices) provocando una anemia por deficiencia de hierro.^{ref(1347)} Un aumento del hierro sérico y tisular también puede ser observado con un consumo excesivo de alcohol y causar una utilización anormal de hierro en la médula ósea. Finalmente, el exceso de alcohol puede provocar una anemia hemolítica aguda.

La inhibición de la médula ósea por el alcohol provoca una disminución en el número de glóbulos blancos^{ref(1348)} y plaquetas^{ref(1349)} circulantes. El alcohol también altera la función de los glóbulos blancos^{ref(1350)}, y la cirrosis alcohólica altera la función plaquetaria,^{ref(1351)} lo que respectivamente provoca un aumento en la susceptibilidad a las infecciones y sangrado. La deficiencia de vitamina K observada en alcohólicos origina un tiempo de protrombina prolongado debido a la falta de factores de coagulación vitamina K dependientes normalmente producidos en el hígado. Cuando la enfermedad hepática es severa, factores de coagulación inadecuados son producidos aún en presencia de vitamina K.

Sistema inmune.

Se sabe que el etanol afecta el sistema inmune. En la mayoría de los pacientes con enfermedad hepática alcohólica, se ha identificado un aumento de los anticuerpos células B circulantes.^{ref(1352)} En pacientes con hepatitis alcohólica se han identificado anticuerpos específicos contra la hialina alcohólica,^{ref(1353)} lo que explicaría la frecuente elevación de inmunoglobulina A.^{ref(1354)} Los principales cambios han sido observados en el sistema inmune celular. El número total de células T está disminuido^{ref(1355)}; su capacidad para sintetizar DNA está deteriorada (transformación linfocítica)^{ref(1356)}; su respuesta a antígenos y mitógenos está suprimida^{ref(1357)}; y sus propiedades citóticas están aumentadas.^{ref(1358)} Todo esto se manifiesta clínicamente por un recuento bajo de linfocitos, anergia a los pruebas cutáneas,^{ref(1359)} respuesta alterada a las vacunas,^{refs(1360)} y susceptibilidad aumentada a las infecciones.

Estas alteraciones inmunológicas pueden ser en parte responsables de algunas de las lesiones de las células hepáticas y de la progresión de la enfermedad observada en pacientes con hepatitis alcohólica.^{refs(1361)}

Patología: Traumatismo y Abuso de Alcohol

Diversos estudios han demostrado que aproximadamente 35% a 55% de los pacientes con traumatismo que ingresan en las salas de urgencias tienen niveles elevados de alcohol en sangre,^{ref(1362)} y muchos de ellos también muestran evidencia de abuso de drogas. La causa más frecuente es el traumatismo por accidente de tráfico. La mitad de los accidentes vehiculares, responsables de 25.000 muertes y más de 500.000 heridos por año, están relacionados con un conductor involucrado con una prueba de alcohol en sangre positiva.^{ref(1363)} Los hombres tienen dos veces más probabilidad que las mujeres de muerte por conducir en estado de embriaguez. En el grupo de 18 a 45 años, sin embargo, la relación es de 3 a 1.^{ref(1364)} Estas cifras ciertamente describen un estado patológico que es endémico en la sociedad de los Estados Unidos. El gran número de pacientes con traumatismo que ingresan en las salas de urgencias implican un desafío para el laboratorio. Un paciente que se presenta con traumatismo y con alteración del nivel de conciencia requiere estudios de laboratorio para determinar en forma inmediata su causa. Deben descartarse como posibles causas de la alteración del nivel de conciencia: traumatismo, trastornos metabólicos, causas infecciosas y



abuso de drogas. El panel de cribado para drogas de abuso debe incluir la determinación de alcohol en sangre. El tratamiento del paciente depende en gran medida del resultado de estos estudios de laboratorio, que deben ser realizados en un tiempo razonablemente corto.

Cambio del Compuesto Analizado en la Enfermedad (Tabla 34-4)

Enzimas

El aumento en los niveles séricos de las enzimas observados en la enfermedad hepática pueden ser el resultado del paso de enzimas a sangre debido al daño producido en las membranas celulares (GOT, GPT y lactato deshidrogenasa), o al incremento de la producción de enzimas (fosfatasa alcalina y GGT).

Aspartato aminotransferasa (GOT) y alanino aminotransferasa (GPT).

Ambas enzimas séricas se encuentran en el hígado y fácilmente escapan de las células durante los procesos de necrosis y daño celular. Aunque la lesión hepática producida por el alcohol está caracterizada por necrosis de las células hepáticas e inflamación, el aumento de estas enzimas es mínimo a moderado, siendo siempre mayor el observado en la GOT. Las alteraciones de esta enzima son frecuentes y aparecen precozmente, pero la magnitud del cambio no siempre es paralelo a la gravedad clínica de la lesión hepática.^{ref(1365)} La causa de esta mínima respuesta enzimática ante la lesión hepática no se conoce con certeza. En algunos pacientes el déficit de piridoxina puede ser uno de los factores que contribuyan a esta baja respuesta enzimática, dado que para las reacciones de transaminación se requiere el piridoxal fosfato. (ver pág. 518, Métodos)

Fosfatasa alcalina.

En la enfermedad hepática alcohólica el aumento de la actividad de esta enzima tiende a ser paralelo a los cambios observados en los niveles de bilirrubina.

5' Nucleotidasa.

5' nucleotidasa no es tan sensible a la lesión hepática como la fosfatasa alcalina. Sin embargo, se mide junto con ésta para determinar si el aumento de la fosfatasa alcalina es el resultado de enfermedad hepatobiliar o de enfermedad ósea.

Gama-glutamilttransferasa.

Se ha observado aumento de los niveles séricos de esta enzima en alcohólicos con enfermedad hepática mínima o ausente. Esto se ha atribuido a una inducción enzimática microsomal mas que a la lesión hepática. (Ver pág. 515)

Bilirrubina

Aunque el alcohol no altera en forma directa el metabolismo de la bilirrubina, la lesión hepática producida por el alcohol sí lo hace. La ictericia, el signo clínico del aumento de bilirrubina, aparece en 60% de los pacientes con hepatitis alcohólica.^{ref(1366)} El aumento de bilirrubina, junto con un tiempo de protrombina prolongado que no responde a vitamina K, y la disminución de albúmina sérica, se correlacionan bien con la gravedad de la hepatitis alcohólica. En algunos casos, los niveles de bilirrubina aumentan conjuntamente con los de fosfatasa alcalina, lo cual podría indicar obstrucción de conductos biliares.^{ref(1367)} Debido a que

los pacientes con hepatitis alcohólica no toleran bien la cirugía, previamente a la misma, deben realizarse procedimientos diagnósticos tales como la colangiografía endoscópica o percutánea para confirmar el diagnóstico de obstrucción extrahepática.

Proteínas

Prealbúmina y albúmina.

La prealbúmina y la albúmina se sintetizan y secretan por el hígado, por lo que sus concentraciones en suero son útiles como parámetros de función hepática. Los niveles séricos de prealbúmina están disminuidos en la malnutrición proteico-calórica (M.P.C.) y en todas las formas de enfermedad hepática, incluyendo aquellas asociadas con alcoholismo. No es raro encontrar valores por debajo de 160 mg/L en la M.P.C. severa.[ref\(1368\)](#) Se considera que la prealbúmina es un parámetro más sensible y específico que la albúmina para el estudio de la M.P.C.

Niveles disminuidos de albúmina sérica en alcohólicos pueden indicar M.P.C. o enfermedad hepática. En un estudio[ref\(1369\)](#) realizado en 111 pacientes con hepatitis alcohólica grave (Veterans Administration Cooperative Study), 18% tenían valores por debajo de 20 g/L, mientras que solamente 1% tenían valores dentro del rango normal. Muchos pacientes con enfermedad hepática alcohólica tienen ascitis con aumento del espacio extravascular, por lo cual el bajo nivel de albúmina sérica observado en ellos puede representar un desplazamiento de la albúmina desde el compartimiento intravascular hacia ese espacio extravascular expandido.

Globulinas.

Los niveles de gama globulinas séricas cambian durante la enfermedad hepática en respuesta a la estimulación antigénica, reflejando los cambios inmunológicos asociados a la enfermedad hepática alcohólica. De los tres tipos de gama globulinas (IgA, IgG e IgM), la IgA es la que más frecuentemente aumenta en la enfermedad hepática alcohólica. Está elevada en el 90% de los casos, con un aumento medio de 118%.[ref\(1370\)](#) IgM es la que menos aumenta, presentando niveles elevados en el 25% de los casos. La IgG aumenta en el 64% de los casos con un aumento medio de 25%.

Lípidos

Triglicéridos y colesterol.

Los niveles séricos de colesterol y triglicéridos están frecuentemente aumentados y son descritos en pág. 654.

Ácidos biliares.

El hígado es responsable de casi todas las etapas del metabolismo de los ácidos biliares, por lo que éstos son indicadores muy sensibles de lesión hepática, aún cuando ésta sea mínima. En la enfermedad hepática alcohólica, los ácidos biliares séricos, especialmente los conjugados de ácido cólico, se correlacionan con los hallazgos de la biopsia.[ref\(1371\)](#) El hígado graso por sí solo no está asociado con niveles elevados, mientras que la hepatitis alcohólica y la cirrosis van acompañadas de aumentos significativos en los niveles séricos. En el estudio[ref\(1372\)](#) realizado por Veterans Administration Cooperative en pacientes con hepatitis alcohólica, la colil glicina estaba alterada con más frecuencia que cualquier otro parámetro de



lesión hepática.

Carbohidratos

Hiperglucemia.

El daño hepatocelular, independientemente de su etiología, es una importante causa de intolerancia a la glucosa y juega un papel importante en la hiperglucemia observada en algunos alcohólicos.^{[ref\(1373\)](#)} Sin embargo, el alcohol raramente es responsable de producir una gran intolerancia a la glucosa o una diabetes franca.^{[ref\(1374\)](#)} La elevación de los niveles de cortisol inducida por el alcohol, especialmente cuando es suficiente para provocar un síndrome de pseudo-Cushing, es otro factor que contribuye a la hiperglucemia alcohólica.^{[ref\(1375\)](#)}

Hipoglucemia.

Aunque la hipoglucemia puede aparecer en la enfermedad hepática grave con insuficiencia hepática fulminante, también aparece asociada al uso de alcohol y a un hígado relativamente normal.^{[ref\(1376\)](#)} La hipoglucemia puede ser la causa de muerte súbita entre los alcohólicos, con una mortalidad de 11% en adultos y 25% en niños.^{[ref\(1377\)](#)} Esta forma de hipoglucemia (en ayunas e inducida por alcohol) aparece en alcohólicos crónicamente malnutridos o cuando se consumen de moderadas a grandes cantidades de alcohol después de un ayuno de 6 a 36 horas.^{[ref\(1378\)](#)} Los pacientes están estuporosos o comatosos, tienen aliento alcohólico y frecuentemente están hipotérmicos. El diagnóstico se realiza mediante los hallazgos clínicos de hipoglucemia y elevado nivel de alcohol en sangre; la acidosis láctica no es rara.^{[ref\(1379\)](#)} Los niveles de insulina plasmática son bajos, mientras que los de glucagón son altos.^{[ref\(1380\)](#)} Aunque la hormona de crecimiento y el cortisol están aumentados, este aumento es aún menor del esperado para la gravedad de la hipoglucemia.^{[ref\(1381\)](#)} El mecanismo de la hipoglucemia es probablemente multifactorial, en el que juega un papel principal la inhibición de la gluconeogénesis provocada por el alcohol.^{[ref\(1382\)](#)} También contribuyen otros factores, como una leve deficiencia adrenocortical, y un defecto en la secreción de la hormona de crecimiento.^{[ref\(1383\)](#)}

Otra forma de hipoglucemia aparece cuando se consume el alcohol conjuntamente con carbohidratos (hipoglucemia reactiva inducida por alcohol).^{[ref\(1384\)](#)} El alcohol tiene la capacidad de potenciar las propiedades insulino-estimulantes de la glucosa.^{[ref\(1385\)](#)} Así, el alcohol consumido en las comidas puede potenciar la secreción de insulina y provocar hipoglucemia nocturna. Las grandes cantidades de café azucarado que habitualmente se utilizan para mitigar los efectos de la intoxicación alcohólica a un paciente, pueden provocar una rápida y grave hipoglucemia reactiva que puede contribuir a que se produzca un accidente de tráfico.

Cetoacidosis alcohólica.

La cetoacidosis es una complicación infrecuente que aparece en alcohólicos no diabéticos.^{[ref\(1386\)](#)} Los pacientes tienen dolor abdominal, vómitos y antecedentes de no ingestión reciente de alimentos. Están acidóticos, pero conscientes, con niveles altos de cetonas en suero, agua y sales disminuidos, y niveles normales de glucosa.^{[ref\(1387\)](#)} El mecanismo de la cetosis alcohólica no está claro.^{[ref\(1388\)](#)} La concentración plasmática de insulina es baja, con niveles altos de cortisol y ligero aumento del nivel de hormona de crecimiento.

Pruebas de Función Hepática



Excreción de verde de indocianina

El verde de indocianina no tiene efectos colaterales, y es rápidamente excretado por la bilis sin conjugarse en el hígado. Este colorante tiene la ventaja de poder ser monitoreado en forma exacta y continua con un densitómetro dicromático colocado en la oreja, eliminando la necesidad de la toma de muestra venosa.[ref\(1389\)](#) Se cree que la eliminación del colorante está relacionada con el flujo sanguíneo en el hígado. Esta prueba es la prueba de excreción de colorante de elección, aunque no sea utilizada en forma rutinaria.

Métodos de Análisis

Alcohol

K. Michael Parker

Principios del análisis y uso corriente.

El alcohol es un importante depresor del sistema nervioso central. Si se ingiere en cantidad suficiente, puede provocar la muerte por depresión irreversible de la respiración. Debido a las serias consecuencias de la intoxicación por etanol, es importante disponer de un rápido análisis para iniciar la terapia apropiada. Además, debido a las implicancias médico legales de la intoxicación por alcohol, el análisis debe ser exacto.[ref\(1390\)](#) Además del etanol, otros alcoholes también pueden estar presentes, como *metanol*, *isopropanol* o *etilenglicol*, y se han desarrollado técnicas específicas su cuantificación.

La medición del etanol puede realizarse en el laboratorio clínico por métodos químicos, enzimáticos y cromatográficos. Además de estas técnicas directas de cuantificación, también pueden utilizarse para la estimación del etanol técnicas indirectas semicuantitativas, como la osmometría por descenso del punto de congelación.

Los primeros métodos químicos para la determinación de etanol estaban basados en la oxidación del etanol por dicromato de potasio u otros agentes oxidantes en un medio fuertemente ácido. (Tabla 34-5, método 1). La reducción del dicromato da como resultado un cambio de color que puede ser medido para monitorear la reacción. La mayoría de los métodos químicos se consideran obsoletos por su tediosidad, falta de adaptación a la automatización y poca especificidad.[ref\(1391\)](#) Es importante recordar que estos métodos químicos no son específicos para etanol, pues también detectan agentes reductores volátiles.

Una modificación de los ensayos químicos es el método de Widmark,[ref\(1392\)](#) que se basa en la simultánea destilación y oxidación del etanol por dicromato. Un método de microdifusión basado esencialmente en el mismo principio ha sido desarrollado recientemente para uso comercial.[ref\(1393\)](#) En este procedimiento, el ácido crómico, reactivo contenido en una lámina de fibra de vidrio, es reducido por acción del etanol a óxido crómico de color azul. Calentando la muestra a 80°C-120°C, el etanol es liberado hacia la lámina de fibra de vidrio que se coloca directamente sobre de la muestra.

En la actualidad, los métodos enzimáticos son los más utilizados para la determinación de etanol. La alcohol deshidrogenasa (ADH), la enzima empleada en estos ensayos, es específica para etanol y no reacciona con metanol o acetona. Sin embargo, la enzima puede mostrar una ligera reacción cruzada con propanol (6% para 2-propanol y 1% para



1-propanol). Aunque la alta especificidad de ADH por etanol asegura la no interferencia con metanol y poca interferencia con isopropanol, los métodos enzimáticos pueden ser la causa de resultados engañosos en casos donde la intoxicación es provocada por la ingestión de isopropanol. La comparación de resultados de los ensayos enzimáticos con otros menos específicos, como los químicos u osmométricos, puede ayudar a identificar la presencia de éstos u otros alcoholes.

El ensayo enzimático (Tabla 34-5, método 2a) está basado en la oxidación del alcohol a acetaldehído con la reducción concomitante de NAD^+ a NADH. El NADH producido puede ser directamente leído a 340 nm, o puede acoplarse a otra reacción alternativa. Abbott desarrolló una variación denominada *atenuación de energía radiante*, que mide el grado de inhibición de la fluorescencia de la fluoresceína resultante de la producción de un producto coloreado (Tabla 34-5, método 2b).^{ref(1394)} En este ensayo, la reacción inicial de ADH con etanol se acopla a una segunda reacción entre NADH y una sal de tetrazolio, yodonitrotetrazolio (INT). Esta reacción adicional, catalizada por la diaforasa, causa la reoxidación de NADH a NAD junto con la generación de un compuesto coloreado formazan-INT. Este producto tiene un pico de absorbancia a 492 nm, que se solapa al espectro de excitación y emisión de la fluoresceína incluida en la mezcla de reacción. La disminución en la intensidad de la fluorescencia es inversamente proporcional a la concentración de etanol presente en la muestra.

Existe buena concordancia entre los métodos enzimáticos y cromatográficos.^{ref(1395)} Sin embargo, algunos métodos enzimáticos pueden dar concentraciones de etanol falsamente elevadas en muestras de pacientes con altos niveles séricos de ácido láctico y lactato deshidrogenasa.^{ref(1396)} Aunque los métodos enzimáticos no son absolutamente específicos para etanol, reúnen los requerimientos de exactitud, precisión y fiabilidad.

La cromatografía de gases (Tabla 34-5, método 3) se considera el método de referencia.^{ref(1397)} La cromatografía no es tan popular como los métodos enzimáticos debido a que requiere de personal experto para su realización, además del hecho de que la compra y mantenimiento de instrumental sofisticado dedicado solamente a una única clase de estudios no es efectivo desde el punto de vista del análisis de costos. Sin embargo, la cromatografía gaseosa ofrece la ventaja de permitir la detección simultánea de otros alcoholes y compuestos volátiles como metanol o isopropanol.

Una consideración importante a tener en cuenta cuando se emplea la cromatografía de gases es el tipo de método de inyección utilizado, análisis directo o por "head-space." La inyección directa de sangre o suero habitualmente requiere que la muestra se diluya con una solución acuosa que contenga el standard interno. Se inyectan pequeños volúmenes (0.5 microlitros) y después de cada inyección debe lavarse cuidadosamente la jeringa. Empleando estas precauciones se aumenta de manera considerable la vida de la columna cromatográfica. Los procedimientos de head-space inyectan dentro del sistema de cromatografía gaseosa una muestra de aire desde un espacio que queda por encima de la sangre en un recipiente cerrado. Este tipo de análisis evita la contaminación de la columna e inyector. Puede obtenerse mayor sensibilidad agregando a la muestra una sal como el cloruro de sodio. La adición de sal provoca un aumento de la concentración de la sustancia volátil en la fase de vapor.

La presencia de alcohol en suero produce un aumento en la osmolalidad del suero cuando ésta se mide mediante la técnica de descenso del punto de congelación (Tabla 34-5, método 4). Los osmómetros que usan la propiedad del descenso de la presión de vapor para



medir osmolalidad no pueden utilizarse para la estimación de la concentración de alcohol debido a que éste es volátil y contribuye significativamente a la presión de vapor por encima de la solución. Este fenómeno producirá una medición falsamente disminuida de la osmolalidad sérica.

En la presencia de alcohol, se produce un aumento de la diferencia entre la osmolalidad medida (por descenso del punto de congelación) y la osmolalidad calculada (ver capítulo 14 acerca de la osmolalidad calculada). Esta diferencia osmolal se correlaciona razonablemente bien con las concentraciones de alcohol en sangre. Sin embargo, se ha descrito una sobreestimación de las concentraciones de alcohol de hasta 30%.^{ref(1398)} Esta discrepancia se ha atribuido al comportamiento osmótico no ideal del etanol, que puede alterar el grado de disociación de solutos dentro de la muestra. Independientemente de estos inconvenientes, la medición de la diferencia osmolal puede ser útil en el diagnóstico de la intoxicación aguda en situaciones de urgencia. Además, la diferencia osmolal es no selectiva respecto del tipo de alcohol detectado, lo que implica que puede ayudar a revelar la presencia de otros alcoholes diferentes al etanol si se dispone de los resultados de las determinaciones enzimáticas de etanol.

Muestra.

Si la determinación se realiza por procedimientos enzimáticos, se puede utilizar suero, plasma u orina. Los anticoagulantes no interfieren con los métodos enzimáticos, ni con los métodos por cromatografía de gases. Cuando se utiliza ésta última, cualquier líquido biológico o tejido puede servir como muestra. Todas las muestras deben estar bien tapadas y preferiblemente refrigeradas, a fin de evitar la pérdida de etanol u otros alcoholes presentes. En muestras selladas de sangre completa no se observó pérdida de etanol durante 14 días cuando fueron almacenadas entre 0°C-3°C, o a temperatura ambiente (22°C-29°C).^{ref(1399)}

Intervalo de referencia.

El etanol, al igual que otros compuestos volátiles como el metanol y el n-propanol, no están presentes en sangre o tejidos en condiciones normales. Una concentración sanguínea de etanol igual o mayor de 3000 µg/mL (65.1 mmol/L) puede provocar coma, mientras que niveles superiores a 4000 µg/mL (86.8 mmol/L) pueden llevar a la muerte. Sin embargo, dado que el metabolismo del alcohol varía en forma substancial de unos individuos a otros, los síntomas asociados con el consumo de etanol pueden presentarse en forma diferente en distintos pacientes.

Referencias

1. US Bureau of the Census: *Statistical abstract of the United States*, 1975, Washington, D.C., 1975, US Government Printing Office.
2. Criteria Committee, National Council on Alcoholism: Criteria for the diagnosis of alcoholism, *Ann Intern Med* 77:249-258, 1972.
3. Bailey RJ, Krasner N, Feddleston ALW, et al: Histocompatibility antigens, autoantibodies, and immunoglobulins in alcoholic liver disease, *Br Med J* 2:727-729, 1976.



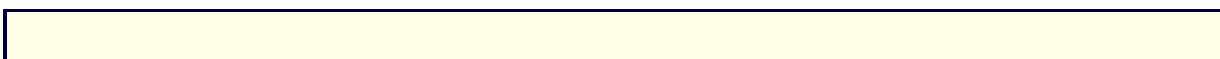
4. Mendenhall CL, Anderson S, Weesner RE, et al: Protein-calorie malnutrition associated with alcoholic hepatitis, *Am J Med* 76:221-222, 1984.
5. Hall P, editor: *Alcoholic liver disease: pathobiology, epidemiology, and clinical aspects*, New York, 1985, Wiley & Sons.
6. Rydberg U, Skerfving S: Toxicity of ethanol: a tentative risk evaluation. In Gross EM, editor: *Alcohol intoxication and withdrawal*, New York, 1977, Plenum Publishing Corp.
7. AMA Council on Scientific Affairs: Alcohol and the driver, *JAMA* 255: 522-527, 1986.
8. Zador PL: *Alcohol-related relative risk of fatal driver injuries in relation to driver age and sex*, Arlington, Va., 1989, Insurance Institute for Highway Safety.
9. Kristensson H, Trell E, Eriksson S, et al: Serum- γ -glutamyl-transferase in alcoholism, *Lancet* 1:609, 1977.
10. Lieber CS: Pathogenesis and early diagnosis of alcoholic liver injury, *N Engl J Med* 298:888-893, 1978.
11. Mendenhall CL, Weesner RE: Alcohols and glycols. In Hanenson IB, editor: *Quick reference to clinical toxicology*, Philadelphia, 1980, JB Lippincott Co.
12. Lieber CS, DeCarli LM: Effect of drug administration on the activity of the hepatic microsomal ethanol oxidizing system, *Life Sci* 9:267-276, 1970.
13. Lieber CS, DeCarli LM: The role of the hepatic microsomal ethanol oxidizing system (MEOS) for ethanol metabolism in vivo, *J Pharmacol Exp Ther* 181:279-287, 1972.
14. Freytmans E, Leighton F: Effects of pyrazole and 3-amino-1,2,4-triazole on methanol and ethanol metabolism by the rat, *Biochem Pharmacol* 22:349-360, 1973.
15. Suter PM, Schutz Y, Jequier E. The effect of ethanol on fat storage in healthy subjects, *N Engl J Med* 326:983-987, 1992.
16. Losowsky MS, Jones DP, Davidson CS, et al: Studies of alcoholic hyperlipemia and its mechanism, *Am J Med* 35:794-803, 1963.
17. Baraona E, Leo M, Borowsky SA, et al: Alcoholic hepatomegaly: accumulation of protein in the liver, *Science* 190:794-795, 1975.
18. Mendenhall CL, and the Cooperative Study Group on Alcoholic Hepatitis: Pathogenesis, diagnosis, and treatment of alcoholic hepatitis, *Clin Gastroenterol* 10:417-441, 1981.
19. Lieber CS, Jones DP, Losowsky MS, et al: Interrelation of uric acid and ethanol metabolism in man, *J Clin Invest* 41:1863-1970, 1962.
20. Olin JS, Devenyi P, Weldon KL: Uric acid in alcoholics, *Q J Study Alcohol* 34:1202-1207, 1973.
21. Newcombe DS: Ethanol metabolism and uric acid, *Metabolism* 21:1193-1203, 1972.
22. Pirola RC, Lieber CS: The energy cost of the metabolism in drugs, including ethanol, *Pharmacology* 7:185-196, 1972.
23. Blackburn GL, Bristrian BR, Maini BS, et al: Nutritional and metabolic assessment of the hospitalized patient, *J Parenter Ent Nutr* 1:11-22, 1977.
24. Leevy CM, Thompson A, Baker H: Vitamins and liver injury, *Am J Clin Nutr* 23:493-498, 1970.
25. Frank O, Baker H, Leevy CM: Vitamin binding capacity of experimentally injured liver, *Nature* 203:302-303, 1964.
26. Leevy, CM, ten Hove W, Frank O, et al: Folic acid deficiencies and hepatic DNA synthesis, *Proc Soc Exp Biol Med* 117:746-748, 1964.
27. Thomson AD, Majumdar SK: The influence of ethanol on intestinal absorption and utilization of nutrients, *Clin Gastroenterol* 10:263-293, 1981.
28. Leevy CML: *Liver regeneration in man*, Springfield, Ill., 1973, Charles C. Thomas.
- 28a. Blass JP, Gibson GE: Abnormality of a thiamine-requiring enzyme in patients with Wernicke-Korsakoff syndrome, *N Engl J Med* 297:1367-1370, 1977.
29. McIntyre N, Morgan MY: Nutritional aspects of liver disease. In Wright R, Alberti KGMM, Karran S, et al, editors: *Liver and biliary disease*, Philadelphia, 1979, Saunders.
30. Cohen JA, Kaplan MM: The SGOT/SGPT ratio: an indicator of alcoholic liver disease, *Dig Dis Sci* 24:835-838, 1979.



31. Herbert V, Zalusky R, Davidson CS: Correlation of folate deficiency with alcoholism and associated macrocytosis, anemia, and liver disease, *Ann Intern Med* 58:977-988, 1963.
32. Baker H, Frank O, Zetterman R, et al: Inability of chronic alcoholics with liver disease to use food as a source of folates, thiamin and vitamin B₆, *Am J Clin Nutr* 28:1377-1380, 1975.
33. Sullivan LW, Herbert V: Suppression of hematopoiesis by ethanol, *J Clin Invest* 43:2048-2062, 1964.
34. Beattie AD, Sherlock S: Ascorbic acid deficiency in liver disease, *Gut* 17:571-575, 1976.
35. Flink EB: Mineral metabolism in alcoholism. In Kissin F, Begleiter H, editors: *The biology of alcoholism*, vol 1, Biochemistry, New York, 1971, Plenum Publishing.
36. Celada A, Rudolph H, Donath A: Effect of experimental chronic alcohol ingestion and folic acid deficiencies on iron absorption, *Blood* 54:906-915, 1979.
37. Powell LW: The role of alcoholism in hepatic iron storage disease, *Ann NY Acad Sci* 252:124-134, 1979.
38. Smith JC, McDaniel EG, Fan FF, et al: Zinc: a trace element essential in vitamin A metabolism, *Science* 181:954-955, 1973.
39. Wolfe SM, Victor M: The relationship of hypomagnesemia to alcohol withdrawal seizures and delirium tremens, *Ann NY Acad Sci* 162:973-984, 1969.
40. Kalbfleisch JM, Lindeman RD, Ginn HE, et al: Effects of ethanol administration on urinary excretion of magnesium and other electrolytes in alcoholic and normal subjects, *J Clin Invest* 42:1471-1475, 1963.
41. Jung RT, Davie M, Chalmers JO, et al: Abnormal vitamin D metabolism in cirrhosis, *Gut* 19:290-293, 1978.
42. Knochel JP: The pathophysiology and clinical characteristics of severe hypophosphatemia, *Arch Intern Med* 137:203-220, 1977.
43. Mathinos PR: Determination of the proximal teratogen of the fetal alcohol syndrome in CD/Mice, *doctoral dissertation, Cincinnati, 1982, University of Cincinnati*.
44. Thomson AD, Bird GL, Saunders JB: Alcoholic liver disease, *Gut*, suppl: S97-103, Sept 1991.
45. Popper H: The problem of hepatitis, *Am J Gastroenterol* 55:335-346, 1971.
46. Durbec JP, Sarles H: Multicenter survey of the etiology of pancreatic diseases: the relationship between the relative risk of developing chronic pancreatitis and alcohol, protein, and lipid consumption, *Digestion* 18:337-350, 1970.
47. Camerson JL, Zuidema GD, Margolis S: A pathogenesis for alcoholic pancreatitis, *Surgery* 77:754-763, 1975.
48. Banks PA, editor: *Pancreatitis*, ed 1, New York, 1979, Plenum Publishing.
49. Sarles H: Chronic calcifying pancreatitis-chronic alcoholic pancreatitis, *Gastroenterology* 66:604-616, 1974.
50. Amman RW, Largiades F, Akovbiantz A: Pain relief by surgery in chronic pancreatitis? Relationship between pain relief, pancreatic dysfunction, and alcohol withdrawal, *Scand J Gastroenterol* 14:209-215, 1979.
51. DiMagno EP, Go VLW, Summerskill WHJ: Relationship between pancreatic enzyme outputs and malabsorption in severe pancreatic insufficiency, *N Engl J Med* 288:813-815, 1973.
52. Marks V: Alcohol and carbohydrate metabolism, *Clin Endocrinol Metab* 7:333-349, 1978.
53. Abel EL, Sokol RJ: Incidence of fetal alcohol syndrome and economic impact of FAS-related abnormalities, *Drug and Alcohol Dependence* 19:51-70, 1987.
54. Schnek EA, Cohen J: The heart in chronic alcoholism: clinical and pathologic findings, *Pathol Microbiol* 35:96-104, 1970.
55. Fisher VJ, Kavalier F: The action of ethanol upon the contractility of normal ventricular myocardium. In Rothschild MA, Oratz M, Schreiber SS, editors: *Alcohol and abnormal protein biosynthesis*, Elmsford, N.Y., 1975, Pergamon Press.
56. Tamarin JS, Weiner S, Poppen R, et al: Alcohol and memory, *Am J Psychol* 127:1659-1667, 1971.
57. Sherlock S: Alcohol and the liver: treatment, early recognition. In Sherlock S, editor: *Diseases of the liver and biliary system*, ed 6, London, 1981, Blackwell Scientific Publications.



58. Keller AZ, Terris M: The association of alcohol and tobacco with cancer of the mouth and pharynx, *Am J Public Health* 55:1578-1585, 1965.
59. Williams RR, Horm JW: Association of cancer sites with tobacco and alcohol consumption and socioeconomic status of patients: interview study from the Third National Cancer Survey, *J Natl Cancer Inst* 58:525-547, 1977.
60. Johnston DG, Alberti KGMM: The liver and the endocrine system. In Wright R, Alberti KGMM, Karran S, et al, editors: *Liver and biliary disease*, Philadelphia, 1979, Saunders.
61. Jenkins JS, Connolly J: Adrenocortical response to ethanol in man, *Br Med J* 2:804-805, 1968.
62. Merry J, Marks V: Hypothalamic-pituitary-adrenal function in chronic alcoholics. In Cross MM, editor: *Alcohol intoxication and withdrawal: experimental studies, Advances in Experimental Medicine and Biology*, New York, 1973, Plenum Publishing.
63. Chalmers RJ, Bennie EH, Johnson RH, et al: Growth hormone, prolactin and corticosteroid responses to insulin hypoglycaemia in alcoholics, *Br Med J* 2:745-748, 1978.
64. Liu YK: Leukopenia in alcoholics, *Am J Med* 54:605-610, 1973.
65. Cowan DH, Hines JD: Thrombocytopaenia of severe alcoholism, *Ann Intern Med* 74:37-43, 1971.
66. McFarland W, Leibre EP: Abnormal leukocyte response in alcoholism, *Ann Intern Med* 59:865-877, 1963.
67. Thomas DP, Ream VJ, Stuart RK: Platelet aggregation in patients with Laennec's cirrhosis of the liver, *N Engl J Med* 276:1344-1348, 1967.
68. Chen T, Kanagasundaram N, Kakumu S, et al: Serum autoantibodies to alcoholic hyalin in alcoholic hepatitis [abstract], *Gastroenterology* A13:813, 1975.
69. Zinneman HH: Autoimmune phenomena in alcoholic cirrhosis, *Am J Dig Dis* 20:337-345, 1970.
70. Bernstein IM, Webster KH, Williams RC Jr, et al: Reduction in circulating T lymphocytes in alcoholic liver disease, *Lancet* 2:488-490, 1974.
71. Hsu CCS, Leevy CM: Inhibition of PHA-stimulated lymphocyte transformation by plasma from patients with advanced alcoholic cirrhosis, *Clin Exp Immunol* 8:749-760, 1971.
72. Kakumu S, Leevy CM: Lymphocyte cytotoxicity in alcoholic hepatitis, *Gastroenterology* 72:524-526, 1977.
73. Smith WI Jr, Van Thiel DH, Whiteside T, et al: Altered immunity in male patients with alcoholic liver disease: evidence for defective immune regulation, *Alcohol Clin Exp Res* 4:199-206, 1980.
74. Sloan EP et al: Toxicology screening in urban trauma patients: drug prevalence and its relationship to trauma severity and management, *J Trauma* 29:1647-1652, 1989.
75. Fell JC, Nash CE: The nature of the alcohol problem in the US fatal crashes, *Health Educ Q* 16:335-343, 1989.
76. *National Highway Traffic Safety Administration: Fatal traffic crashes in 1987*, Washington, D.C., 1988, NHTSA.
77. Kaplan LA, editor: *Standards of laboratory practice: assessment of nutrition of hospitalized patients*, Cincinnati, 1994, National Academy of Clinical Biochemistry.
78. Milstein HJ, Bloomer JR, Klatskin G: Serum bile acids in alcoholic liver disease, *Am J Dig Dis* 21:281-295, 1976.
79. Lundquist GAR: Glucose tolerance in alcoholism, *Br J Addict* 61:51-55, 1965.
80. Rees LH, Besser GM, Joffcoate WJ, et al: Alcohol-induced pseudo-Cushing's syndrome, *Lancet* 1:726-728, 1977.
81. Madison LL, Lochner A, Wulff J: Ethanol induced hypoglycemia. II. Mechanism of suppression of hepatic gluconeogenesis, *Diabetes* 16:252-258, 1967.
82. Joffe BI, Seftel HC, Van As M: Hormonal responses in ethanol-induced hypoglycaemia, *J Stud Alcohol* 36:550-554, 1975.
83. Arky RA, Freinkel N: Alcohol hypoglycemia. V. Alcohol infusion to test gluconeogenesis in starvation, with specific reference to obesity, *N Engl J Med* 274:426-433, 1966.
84. O'Keefe SJ, Marks V: Lunchtime gin and tonic, a cause of reactive hypoglycaemia, *Lancet* 1:1286-1288, 1977.



- 1977.
85. Cooperman MT, Davidoff F, Spark R, et al: Clinical studies of alcoholic ketoacidosis, *Diabetes* 23:433-439, 1974.
 86. Leevy CM, Smith F, Longueville J, et al: Indocyanine green clearance as a test for hepatic function: evaluation by dichromatic ear densitometry, *JAMA* 200:236-240, 1967.
 87. Caplan YH: Blood, urine, and other fluid and tissue specimens for alcohol analysis. In Garriott JC, editor: *Medicolegal aspects of alcohol determination in biological specimens*, Littleton, Mass., 1988, PSG (Mosby, St. Louis), pp 74-75.
 88. Tagliaro F, Lubli G, Ghielmi S, et al: Chromatographic methods for blood and alcohol determination, *J Chromatogr* 580:161-190, 1992.
 89. Widmark EMP: Modification of the Niclocex method for estimating ethyl alcohol, *Skand Arch Physiol* 35:125-130, 1916.
 90. Bachand SS, Gaor MJ, Martel PA, O'Donnell CM: Alcohol detection by microdiffusion [Letter], *Clin Chem* 35:1269, 1989.
 91. Yost DA, Boehnlein L, Shaffer M: A novel assay to determine ethanol in whole blood on the Abbott TDX, *Clin Chem* 30:1029A, 1984.
 92. Jortani SA, Poklis A: Emit\RTS\ plus ethyl alcohol assay for the determination of ethanol in human serum and urine, *J Anal Toxicol* 16:368-371, 1992.
 93. Badcock NR, O'Reilly DA: False-positive EMIT\RTS\ ethanol screen with post-mortem infant plasma, *Clin Chem* 38:434, 1992.
 94. Bhagat CI, Beilby JP, Garcia-Webb P, Dusci LJ: Errors in estimating ethanol concentration in plasma by using the "osmolal gap," *Clin Chem* 31:647-648, 1985.
 95. Winek CL, Paul LJ: Effect of short-term storage conditions on alcohol concentrations in blood from living human subjects, *Clin Chem* 29:1959-1960, 1983.

Tablas

Tabla 34-1. Niveles de alcohol en sangre y síntomas.

Alcohol en sangre (mg/L) de intoxicación	Signos físicos	Grado
< 500 Generalmente, ninguno 1000 <i>Legalmente intoxicado</i>	Estado relajado	
2000 - 2500	Atención disminuida Intoxicación importante Letargia pronunciada Esfuerzo para mantener control emocional y motor	
3000 - 3500	Estupor y coma	



> 5000

Probabilidad de muerte.

Tabla 34-2. Vitaminas en el alcohólico.

Vitamina	Clasificación	Efecto del alcohol en la absorción intestinal	Incidencia (%) de bajos niveles séricos en cirrosis alcohólica
A		Liposoluble	Disminuida
B ₁ (tiamina)		Hidrosoluble	Disminuida
B ₂ (riboflavina)		Hidrosoluble	Sin efecto
Acido nicotínico		Hidrosoluble	No evaluado
B ₆ (piridoxina)		Hidrosoluble	Sin efecto
Acido fólico		Hidrosoluble	Sin efecto
B ₁₂ (cianocobalamina)		Hidrosoluble	Disminuida
C (ácido ascórbico)		Hidrosoluble	No evaluado
D		Liposoluble	No evaluado
E		Liposoluble	No evaluado
K		Liposoluble	No evaluado

Tabla 34-3. Rasgos clínicos iniciales y complicaciones de la hepatitis alcohólica.*

Rasgo o complicación	Severidad de la enfermedad		
	Leve	Moderada	Severa
AnorexiaH	46.2	63.0	65.7
Pérdida de peso	36.8	27.1	16.2
Fiebre	18.0	26.2	19.2
Hepatomegalia	85.9	97.1	88.9
EsplenomegaliaH	24.5	38.6	46.2
Infección	5.2	16.8	8.1
Pancreatitis	13.6	10.3	10.1
Sangrado gastrointestinal	10.4	7.5	14.1
Ascitis			
Leve	18.7	19.4	17.2
Moderada	11.0	38.0	45.5
Severa	1.3	20.4	29.3
CombinadasH	31.0	77.8	92.0
Encefalopatía			
Grado 1	17.3	29.6	25.3

Grado 2	4.5	24.1	41.4
Grados 3 y 4	0.7	3.7	0.0
Combinadasb	2.5	57.4	66.7
Probabilidad de sobrevida			
1 año'	0.91 ± 0.027	0.75 ± 0.045	0.46 ± 0.055
<p>De Mendenhall CL, Anderson S., Weesner RE, et al; Am J Med 73:221-222, 1984.</p> <p>*El diagnóstico de las diversas condiciones y rasgos que pueden complicar el cuadro no fue definido en el protocolo, pero fue determinado por el criterio clínico de cada investigador participante. Debido a que n varía en los distintos grupos clasificados de acuerdo a la severidad (leve, 156; moderada, 108; severa, 99), los valores se expresan como un porcentaje del total. El análisis de los datos consiste en un test de chi-cuadrado, el cual, cuando fue significativo para el nivel 0.05, fue seguido de un test de Bartholomew. El orden hipotético fue $p_{\text{leve}} < p_{\text{moderada}} < p_{\text{severa}}$ excepto para la pérdida de peso, donde la presencia de ascitis revierte el orden hipotético. $H p < 0.005$ (test de Bartholomew). La incidencia disminuida de la pérdida de peso con el aumento de la severidad representa una mayor incidencia de ascitis.</p> <p>' $p < 0.006$. Todas las comparaciones (leve, moderada, severa) determinadas por un test estadístico de distribución normal.</p>			

Tabla 34-4. Prevalencia de alteraciones de laboratorio en hepatitis alcohólica.

Dirección en el cambio del		Incidencia de resultados anormales, % (LNS x X media del grupo)*		
Prueba	compuesto analizado	Grupo I	Grupo II	Grupo III
Hemoglobina	Disminución	74 (0.70)	85 (0.66)	93 (0.60)
Hematocrito	Disminución	76 (0.80)	83 (0.76)	95 (0.70)
VCM	Aumento	73 (1.1)	83 (1.1)	90 (1.1)
	Disminución	2	8	0
Glóbulos blancos	Aumento	13	7 (1.1)	54 (1.24)
	Disminución	11 (0.8)	9	8
ASAT (TGO)	Aumento	79 (2.1)	98 (3.1)	91 (2.5)
ALAT (SGPT)	Aumento	62 (1.9)	73 (1.9)	56 (1.9)
Bilirrubina total	Aumento	53 (1.6)	100 (13.5)	100 (18.7)
Fosfatasa alcalina	Aumento	67 (1.4)	100 (2.3)	88 (1.9)
Tiempo de protrombina	Aumento	65	90	100
BUN	Aumento	3	17 (0.7)	36 (1.4)
	Disminución	3 (0.5)	0	0

Creatinina	Aumento	2 (0.60)	17 (0.76)	29 (1.35)
Albúmina	Disminución	36 (0.74)	90 (0.54)	96 (0.48)
Colilglicina	Aumento	85 (8.2)	100 (25.2)	100 (15.1)
Inmunoglobulinas				
IgG	Aumento	49 (1.1)	72 (1.3)	83 (1.6)
Ig A	Aumento	84 (1.7)	98 (2.6)	93 (2.8)
Ig M	Disminución	17 (0.66)	26 (0.73)	43 (0.95)

De: Leevy CM, Cardi L., Frank O. Et al: *Am J Nutr* 17:259-271,1965

* Los datos se expresan como cambio en los valores del parámetro de laboratorio, y la incidencia de resultados anormales se expresa como el porcentaje del total y la magnitud del cambio (número de veces el límite superior normal [LSN] para la media); n = 89 para el Grupo I, 58 para el II, y 37 para el III.

Tabla 34-5. Métodos para la determinación de alcohol.

Método	1. Destilación-oxidación
Tipo de análisis	Colorimétrico
Principio	El alcohol difunde en la fase gaseosa y reacciona con un agente oxidante, cambiando su color: $2K_2Cr_2O_7 + 10H_2SO_4 + 3C_2H_5OH \rightarrow$ (amarillo-naranja) $2Cr_2(SO_4)_4 + 2K_2SO_4 + 3CH_3COOH$ (azul- verdoso)
Uso	Se usa rara vez
Comentarios	No específico; da reacción con todos los volátiles; todos los fluidos corporales; tejido
Método	2. Enzimático
Tipo de análisis	a. Espectrofotométrico
Principio	$NAD^+ + \text{Alcohol} \xrightarrow{\text{alcohol deshidrogenasa}} NADH + H^+ + \text{Acetaldehído}$
Uso	Rutinario; suero; frecuentemente usado
Comentarios	Específico para etanol; otros alcoholes no se pueden medir fácilmente
	b. Fluorométrico



		0. Fluorimétrico
Principio	Reacción como en (2a) más NADH → NAD ⁺ + colorante de monotetrazolio reducido (fluorescencia de fluoresceína disminuida)	
Uso	Rutinario	
Comentarios	Específico para etanol; otros alcoholes no se pueden medir fácilmente	
Método	3. Cromatografía de gases	
Tipo de análisis	Ionización de flama	
Principio	El alcohol se separa en un columna cromatográfica	
Uso	Rutinario; todos lo fluidos corporales; comúnmente usado	
Comentarios	Específico para todos los alcoholes	
Método	4. Osmometría	
Tipo de análisis	Abatimiento del punto de congelación	
Principio	El alcohol en alta concentración aumenta la osmolalidad; la diferencia entre el valor calculado y el medido es proporcional a los niveles de alcohol	
Uso	Suero	
Comentarios	No específico; detecta otras sustancias volátiles	

Figuras

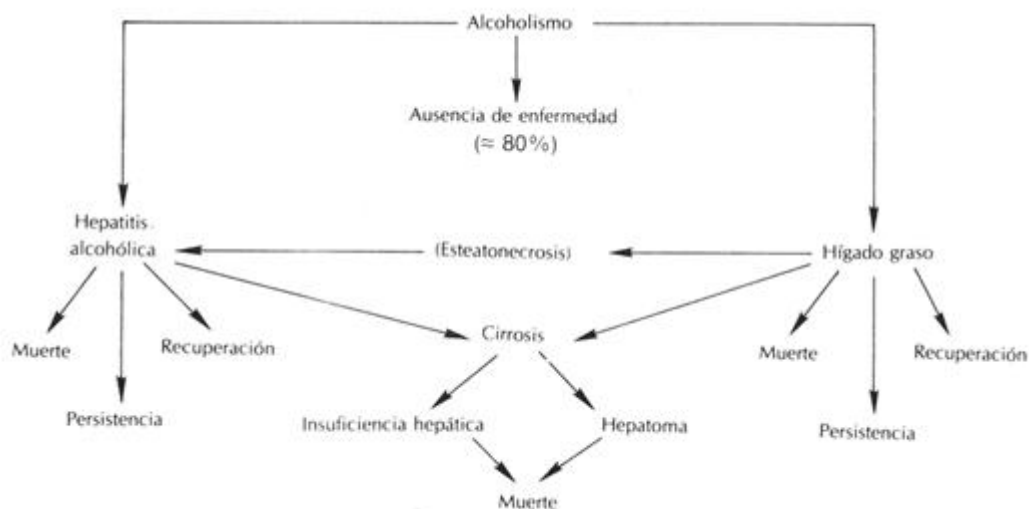


Figura 34-1 Enfermedad Hepática alcohólica.

CAPÍTULO 35

35. Metabolismo del Hierro, Porfirina y Bilirrubina

William E. Schreiber

PARTE I: METABOLISMO DEL HIERRO

Función

Metabolismo

Absorción

- Recambio celular de los eritrocitos
- Transporte e incorporación a la célula
- Almacenamiento

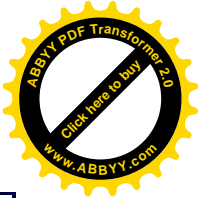
Condiciones patológicas

Deficiencia de hierro

- Exceso de hierro
- Cambio del compuesto analizado en la enfermedad

Estudios hematológicos

- Hierro sérico
- Capacidad total de fijación del hierro y saturación de la transferrina



Ferritina sérica
Protoporfirina eritrocitaria libre

PARTE II: SÍNTESIS DE HEMO Y LAS PORFIRIAS

Estructura y función

Bioquímica

Vía sintética

Puntos de interés

Condiciones patológicas

Porfirias neurológicas

Porfirias cutáneas

Trastornos secundarios del metabolismo de las porfirinas

Cambio del compuesto analizado en la enfermedad

Porfobilinógeno

Acido delta aminolevulínico

Porfirinas urinarias

Porfirinas fecales

Porfirinas eritrocitarias

Ensayos enzimáticos

Genética molecular

PARTE III: BILIRRUBINA

Formación y estructura

Metabolismo

Producción

Transporte

Incorporación hepática, conjugación y excreción

Tránsito intestinal

Condiciones patológicas: hiperbilirrubinemia

Sobreproducción

Incorporación disfuncional

Conjugación defectuosa

Excreción reducida

Obstrucción

Cambios del compuesto analizado en la enfermedad

Bilirrubina

Delta bilirrubina

Urobilinógeno



MÉTODOS DE ANÁLISIS

Hierro y capacidad total de fijación de hierro

Porfobilinógeno

OBJETIVOS

- ♦ Enumerar las funciones fisiológicas del hierro y describir su absorción a partir del tubo digestivo y su transporte en el cuerpo.
- ♦ Describir las condiciones patológicas que conducen a la deficiencia y al exceso de hierro, y describir los cambios en los siguientes compuestos analizados en la anemia por deficiencia de hierro, anemia por enfermedad crónica, talasemia, hemocromatosis, e intoxicación por plomo: ferritina, hierro sérico, capacidad de fijación de hierro, y protoporfirina eritrocitaria libre.
- ♦ Definir la porfiria y distinguir entre las porfirias primarias y secundarias.
- ♦ Enumerar los compuestos analizados de porfirinas que se encuentren elevados en las porfirias, tanto primarias como secundarias.
- ♦ Reseñar la formación y el catabolismo de la bilirrubina

Términos Clave

ámpula de Vater La unión del ducto biliar común y el ducto pancreático proximal en su entrada al duodeno.

anemia Una reducción en la cantidad de hemoglobina o del número de glóbulos rojos en la sangre.

anemia hemolítica Anemia causada por una sobre vivencia corta de los glóbulos rojos maduros.

anemia megaloblástica Anemia caracterizada por precursores agrandados de los glóbulos rojos en la médula ósea.

anemia perniciosa Una anemia megaloblástica causada por una falla en la absorción de la vitamina B₁₂.

anemia sideroblástica Un grupo heterogéneo de anemias en el cual el almacenamiento de hierro en los tejidos reticuloendoteliales está aumentado y los normoblastos de la médula ósea contienen depósitos de hierro dentro de las mitocondrias (sideroblastos anillados).

bilis El fluido verde amarillento secretado por el hígado y vertido al duodeno a través de los ductos biliares.

canalículo biliar Los canales finos tubulares que circulan entre las células del hígado en donde la bilis es secretada.

cirrosis Una enfermedad del hígado caracterizada por la pérdida de la arquitectura microscópica normal, con fibrosis y regeneración nodular.

colestasis La interrupción del flujo biliar.

concentración media de hemoglobina corpuscular (CMHC) La concentración promedio de hemoglobina por glóbulo rojo.

eritropoyesis La producción de eritrocitos.

fagocito Cualquier célula que ingiere microorganismos, otras células o partículas extrañas.

fotoisómeros Isómeros producidos por exposición a la luz.

fotosensibilidad Reactividad anormal de la piel a la luz solar.

hemoglobina corpuscular media (HCM) La cantidad promedio de hemoglobina por glóbulo rojo.



hipocrómico Se refiere a los eritrocitos que son más pálidos que los normales debido a una disminución en el contenido de hemoglobina.

microcítico Se refiere a los eritrocitos que son menores que el intervalo de referencia.

parénquima El tejido funcional de un órgano (excluyendo el marco fibroso).

porfirinuria La presencia de porfirinas en exceso en la orina.

quelato Un compuesto químico en el cual un ion metálico está firmemente unido a una molécula quelante.

sistema reticuloendotelial Un sistema funcional compuesto de células altamente fagocíticas con atributos tanto endotelial como reticular, localizado en los vasos sanguíneos, nódulos linfáticos, hígado, bazo, médula ósea, y otros tejidos.

talasemia Un grupo heterogéneo de anemias hemolíticas hereditarias que exhiben una velocidad reducida de síntesis de una o más cadenas polipeptídicas de la hemoglobina.

taquicardia Velocidad alta del pulso cardíaco.

volumen corpuscular medio (VCM) El volumen promedio de los glóbulos rojos.

Parte I: Metabolismo del Hierro

Función

El hierro es uno de los elementos más abundantes en la tierra, aunque en las células vivas solamente se encuentra presente en cantidades traza. La mayor parte del hierro en los humanos se encuentra dentro del anillo de porfirina del hemo, el cual es incorporado a las proteínas tales como la hemoglobina, mioglobina, catalasa, peroxidasas, y citocromos. Hay también proteínas hierro-azufre, como la NADH deshidrogenasa y la succinato deshidrogenasa, en las que el hierro está presente en agrupaciones con azufre inorgánico. En todos estos sistemas, lo que hace que el hierro sea biológicamente indispensable es su habilidad para interactuar reversiblemente con el oxígeno y funcionar en las reacciones de transferencia de electrones.

Un hombre adulto promedio tiene alrededor de 4g de hierro corporal. Alrededor del 65% al 70% del total se encuentra en la hemoglobina, y cerca del 10% está localizado en la mioglobina y las otras enzimas y proteínas que contienen hierro. El 20 a 25% restante consiste de una fuente de almacenamiento de hierro. En comparación, la mujer adulta promedio tiene solamente 2 a 3 g de hierro en su cuerpo. Esta diferencia es atribuible en parte a que en las mujeres las reservas de hierro son mucho menores. Hay también menos hierro en la hemoglobina porque las mujeres tienen una concentración baja de hemoglobina en la sangre y un volumen vascular menor que el de los hombres. La distribución del hierro se resume en la Tabla 35-1.

Metabolismo

Los requerimientos diarios de hierro varían dependiendo de la edad de la persona, del sexo y del estado fisiológico. Aun cuando el hierro no es excretado en el sentido

convencional, hay una pérdida diaria de 1mg a través del desprendimiento normal de las células epiteliales de la piel, y de las células que cubren los tractos gastrointestinal y urinario. Cantidades menores de eritrocitos se pierden en la orina así como en las heces. Una entrada de hierro de 1 mg por día es por lo tanto suficiente para los hombres y las mujeres postmenopáusicas. Sin embargo, debido a que la pérdida de sangre el ciclo menstrual acarrea de 20 a 40 mg de hierro, las mujeres en sus años reproductivos necesitan 2 mg de hierro por día. La desviación de hierro al feto en crecimiento durante el embarazo, la pérdida de sangre durante el nacimiento, y la alimentación mamaria subsiguiente en el bebé consume 900 mg de hierro en promedio. Este aumento de hierro diario demanda de 2 a 4 mg en las mujeres embarazadas y en lactancia.

Absorción

Una dieta estadounidense saludable contiene entre 10 a 30 mg de hierro por día. De esta cantidad, se absorbe solamente del 5% al 10% principalmente en el duodeno y en el intestino delgado superior. La mayor parte del hierro de la dieta se encuentra en el estado férrico (Fe^{3+}). El Fe^{3+} es soluble en el pH ácido del estómago pero se torna insoluble en el pH más alcalino del duodeno. El ácido gástrico, que convierte al Fe^{3+} en la forma mejor absorbible Fe^{2+} , así como los componentes de la dieta que forman quelatos de hierro solubles (como el ácido ascórbico, azúcares, y los aminoácidos), aumenta la absorción del hierro. Las sustancias que forman complejos insolubles con el hierro, como los fosfatos (en huevos, queso y leche), los oxalatos y fitatos (en los vegetales) y los tanatos (en el té), disminuyen la absorción del hierro. El hierro hemo, que proviene principalmente de la carne y pescado, es procesado diferentemente. Después de que es liberado de la cadena polipeptídica que le rodea, el hemo es absorbido intacto por la célula de la mucosa, en donde el anillo de porfirina se rompe y el hierro es liberado. Este proceso es más eficiente que la absorción del hierro no hémico y no está afectado por los factores de la dieta.

Debido a que la pérdida de hierro es un proceso continuo y no regulado en su mayor parte, el balance de hierro es controlado por cambios en la absorción. Las células intestinales toman considerablemente más hierro que el 5% a 10% que finalmente entra en la circulación. Una vez dentro de la célula intestinal el hierro es transferido directamente al plasma o es incorporado a la ferritina para almacenamiento. El hierro almacenado puede ser movilizado subsecuentemente si es necesario, pero la mayor parte de este hierro se pierde cuando las células de la mucosa se desprenden. Nuevas células toman su lugar, y el ciclo del hierro comienza nuevamente.

Los mecanismos que controlan la transferencia de hierro desde la mucosa intestinal hacia el plasma no son bien comprendidos (Fig. 35-1). El efecto total es evitar la absorción de exceso de hierro mientras se mantiene un adecuado suministro para las necesidades generales. Los factores más importantes que afectan la absorción de hierro son los almacenamientos de hierro corporal y la velocidad de producción de glóbulos rojos. Cuando es necesario, la eficiencia en la absorción puede aumentar en tres o más veces. Por consiguiente, la deficiencia de hierro, el embarazo, y la eritropoyesis acelerada que ocurre en la anemia, estimulan el aumento de absorción de hierro. Por otro lado, la absorción se encuentra reducida después de un consumo de grandes cantidades inusuales de hierro (tales como, suplemento o envenenamiento por hierro).



Recambio celular de los eritrocitos

El hierro absorbido representa solamente una fracción del hierro requerido para la síntesis del hemo. La mayor parte del hierro necesario, de 20 a 25 mg/día, proviene de la destrucción de los eritrocitos viejos por los macrófagos de los tejidos, principalmente en el bazo. Dentro de estas células, la hemooxigenasa rompe el anillo de porfirina para liberar el hierro. Los macrófagos transfieren la mayor parte del hierro a la transferrina del plasma, la cual entonces lo transporta a la médula ósea para la síntesis de la hemoglobina. De esta manera, el sistema retículoendotelial recicla el hierro usado en los glóbulos rojos viejos para que sea utilizado en los nuevos glóbulos rojos.

Los macrófagos también mantienen una fuente de almacenamiento de hierro. Cuando la destrucción de los glóbulos rojos excede la velocidad de producción, el hierro se acumula dentro de los macrófagos y la reserva de almacenamiento se expande. Cuando el balance se desvía hacia la producción de glóbulos rojos, los macrófagos liberan hierro adicional a partir de sus depósitos. La infección, inflamación, y la neoplasia maligna interfieren con la liberación del hierro a partir de los macrófagos y pueden causar una caída en la producción de glóbulos rojos a pesar de la presencia de reservas de hierro adecuadas.

Transporte e incorporación a la célula

La transferrina, una glicoproteína de una sola cadena con un peso molecular de 79,500 daltones, es la proteína de transporte para el hierro en la sangre. Cada molécula de transferrina tiene dos sitios de unión para el Fe^{3+} , y de 20% a 50% de estos sitios se encuentran normalmente saturados. La necesidad de una proteína transportadora específica deriva de la toxicidad e insolubilidad del hierro libre; virtualmente los 3 a 4 mg de hierro se encuentran unidos a proteína. El transporte de hierro es un proceso dinámico, y la vida media de un átomo de hierro en el plasma es entre 60 y 120 minutos bajo circunstancias normales.

La transferrina libera hierro en las células con receptores de superficie específicos para esta proteína. Después de la unión al receptor, el complejo receptor-transferrina/transferrina, es tomado por la célula vía endocitosis y es incorporado dentro de una vesícula. Al pH ácido de la vesícula, el hierro es liberado de la transferrina. El complejo receptor-apotransferrina es luego devuelto a la superficie celular, en donde tanto la apotransferrina como el receptor se tornan disponibles para ciclos adicionales de transporte y entrada de hierro. Dentro de la célula, el hierro es utilizado para la síntesis del hemo dentro de la mitocondria o es almacenado como ferritina.

Almacenamiento

El hierro es almacenado en los tejidos en cualquiera de las dos formas, ferritina u hemosiderina. La ferritina consiste de una cubierta proteica constituida de varias subunidades, conocida como *apoferritina*, rodeando un centro de hasta 4500 átomos de hierro. El hierro en la ferritina es depositado dentro de su centro como un complejo de hidroxifosfato férrico. La ferritina está presente en la mayor parte de las células y es una forma rápida de movilizar el hierro almacenado. Sirve para empaquetar y aislar los átomos de hierro a partir del ambiente intracelular, evitando de esta manera cualquier acción tóxica en los constituyentes celulares. La *hemosiderina* es un complejo insoluble derivado de la ferritina que ha perdido alguna de sus proteínas de superficie y se vuelve una forma agregada. Se encuentra presente en gránulos



de 1 a 2 μm de diámetro y es visible a través del microscopio óptico después de ser teñido con azul de Prusia. La hemosiderina tiene una concentración mayor de hierro que la que posee la ferritina, pero libera hierro más lentamente.

Alrededor de un tercio de las reservas de hierro corporal se almacena en el hígado, un tercio en la médula ósea, y el restante en el bazo y otros tejidos.

Condiciones Patológicas

Deficiencia de hierro

Cuando la absorción de hierro disminuye por debajo de la cantidad requerida para la producción de glóbulos rojos, se agotan las reservas de hierro, y con el tiempo sobreviene anemia. La deficiencia de hierro es un desorden alimenticio común en los humanos y es la causa más frecuente de anemia. Se estima que alrededor del 3% de los hombres adultos, 20 % de las mujeres en su etapa reproductiva y 50% de las mujeres embarazadas son deficientes en hierro.

La elevada prevalencia de la deficiencia de hierro entre las mujeres es el resultado de la pérdida de sangre que ocurre durante cada ciclo menstrual. El sangrado del tracto gastrointestinal es la causa común de deficiencia de hierro en los hombres. La demanda aumentada de hierro en bebés y niños pequeños, adolescentes y mujeres embarazadas puede conducir también a deficiencia de hierro, especialmente si estos individuos tienen dietas bajas en hierro. Los trastornos en la absorción de hierro después de una gastrectomía y en pacientes con diarrea crónica o mala absorción también causan agotamiento de las reservas de hierro.

La deficiencia de hierro se lleva a cabo en estadios, el primero de los cuales es el agotamiento del almacenamiento de hierro en respuesta a un prolongado balance negativo de hierro. Una vez que las reservas de hierro se han agotado, los análisis bioquímicos del metabolismo del hierro se vuelven anormales. Luego, se observa una caída en la concentración de hemoglobina en la sangre, y al tiempo los glóbulos rojos se vuelven más pequeños y pálidos que los normales. En la anemia desarrollada completamente por deficiencia de hierro, un conteo sanguíneo completo revela una disminución en la hemoglobina y en todos los índices de glóbulos rojos: volumen corpuscular medio (VCM), hemoglobina corpuscular media (HCM) y concentración de hemoglobina corpuscular media (CMHC). El examen de un frotis sanguíneo periférico muestra eritrocitos que son hipocrómicos y microcíticos con una variación anormal en el tamaño y la forma. En la médula ósea se visualiza hierro que no se puede teñir.

Los análisis de laboratorio sobre el estado de hierro pueden distinguir la deficiencia de hierro de otras causas de anemia hipocrómica microcítica (Tabla 35-2). La concentración de hierro sérico disminuye, mientras que aumenta la capacidad total de fijación de hierro (CTFH), la cual mide la capacidad de la transferrina para el hierro, se incrementa. La saturación de la transferrina, calculada como la concentración de hierro dividida por la CTFH, se encuentra muy por debajo de su valor saludable. Una disminución en la ferritina sérica, la cual representa un reflejo de las reservas de hierro corporal, es el indicador simple más confiable de la deficiencia de hierro. La protoporfirina eritrocitaria se encuentra aumentada, pero este aumento no es específico de la deficiencia de hierro, y la medición de este compuesto se utiliza



más bien como una prueba exploratoria.

Exceso de hierro

Hemocromatosis.

La hemocromatosis es un desorden hereditario caracterizado por un aumento progresivo en las reservas de hierro, conduciendo a una disfunción y daño del órgano. La herencia es autosómica recesiva. Entre las poblaciones de descendientes del norte de Europa, alrededor del 10% de las personas llevan el gen y 0.3% son homocigotos. Por razones que no están aun claramente comprendidas, solamente una fracción de los homocigotos desarrolla completamente la enfermedad. Los hombres son afectados de cinco a 10 veces más frecuentemente que las mujeres debido al efecto protector de la pérdida de sangre menstrual y al embarazo. Los síntomas de la enfermedad son generalmente aparentes antes de los 40 años de edad.

Los pacientes con hemocromatosis absorben 4mg de hierro o más por día, aun con una dieta normal. El mecanismo de aumento en la absorción del hierro permanece desconocido. Bajo condiciones normales, el exceso de hierro es procesado por las células del sistema retículoendotelial. Sin embargo, en individuos con hemocromatosis, el hierro se deposita directamente en las células parenquimales del hígado, páncreas, corazón y otros órganos. Después de acumularse por años, las cantidades excesivas del hierro intracelular conducen a daño tisular y por último a la falla del órgano. En este estado, la cantidad de almacenamiento de hierro puede exceder los 20g.

Varios sistemas son afectados por hemocromatosis. El hígado se encuentra generalmente agrandado y al tiempo puede tornarse cirrótico, predisponiendo a los pacientes a un alto riesgo inusual de carcinoma hepatocelular. Alrededor de los dos tercios de los pacientes desarrollan diabetes mellitus; tanto una predisposición genética como un daño directo al páncreas a partir de exceso de hierro parecen jugar un papel en el desarrollo de la diabetes. La mayoría de los pacientes muestra un aumento en la pigmentación de la piel como resultado de la producción aumentada de melanina y de la deposición de hierro dentro de la piel. El daño cardíaco se expresa como falla congestiva del corazón o arritmias. La atrofia testicular en los hombres es causada por una caída en la producción de gonadotropinas por la glándula pituitaria, otro sitio de depósito de hierro. La artritis también aparece en más de la mitad de los pacientes.

En la hemocromatosis, la concentración de hierro sérico aumenta y la capacidad total de fijación de hierro (CTBH) disminuye, en contraste a los cambios que se observan en la deficiencia de hierro. La saturación de la transferrina es mucho mayor que el intervalo de referencia y constituye un índice particularmente sensible al exceso de hierro. La concentración de ferritina sérica está aumentada al comienzo del curso de la enfermedad, antes de que se vuelvan aparentes los signos y síntomas. La prueba definitiva para la hemocromatosis está constituido por la medida y la evaluación histoquímica del hierro hepático en un espécimen de biopsia del hígado.

El gen para la hemocromatosis no ha sido aun identificado, pero se encuentra localizado en un brazo corto del cromosoma 6 cerca del locus del antígeno leucocitario humano (mas conocido por su acrónimo en inglés, HLA). En familias con un paciente conocido, a menudo es posible identificar otros homocigotos y heterocigotos al analizar los

miembros de la familia para sus haplotipos HLA y llevar a cabo análisis genético de ligamiento. Una vez que se aísla el gen para la hemocromatosis y que se definan las mutaciones que provocan la enfermedad, se dispondrá de pruebas más específicas y confiables basadas en el análisis de DNA.

Hemacromatosis adquirida.

El exceso de hierro puede también ser un trastorno adquirido. Primeramente, el hierro en exceso es depositado preferentemente en las células retículoendoteliales del hígado, bazo y médula ósea, en vez de que ocurra directamente en las células del parénquima. Los tejidos permanecen anatómicamente y funcionalmente saludables. A medida que aumenta la cantidad de hierro, su patrón de distribución cambia, y el hierro es depositado en las células parenquimales del hígado, páncreas, corazón y otros órganos. El cuadro clínico entonces se parece a la forma hereditaria de hemocromatosis.

La hemocromatosis adquirida puede ser una complicación de anemias en las que existe eritropoyesis inefectiva, como la β -talasemia (ver pág. 727). En esta enfermedad no solamente aumenta la absorción del hierro, sino que los pacientes son tratados con múltiples transfusiones sanguíneas, lo cual aumenta adicionalmente su carga de hierro. Los alcohólicos con enfermedad crónica del hígado pueden también desarrollar un aumento en las reservas de hierro tisular, pero aquellos con exceso masivo de hierro probablemente tengan la forma genética de la hemocromatosis. Es raro que el uso de suplemento medicinal de hierro por sí sólo sea causa de hemocromatosis.

Cambio del Compuesto Analizado en la Enfermedad

Existen tres compartimentos para el hierro, que responden del 90% del total de hierro corporal, que el laboratorio clínico puede medir. El mayor de estos reservorios es el hierro contenido en la hemoglobina, que se mide como parte de un examen completo de sangre. El siguiente compartimento más grande es el del almacenamiento tisular, y la concentración de ferritina sérica es proporcional al tamaño de este reservorio. Finalmente, el hierro circulante es evaluado midiendo las concentraciones séricas de hierro y de su proteína de transporte, la transferrina. Esta combinación de estudios hematológicos y bioquímicos permite a uno identificar los trastornos en el metabolismo de hierro.

Estudios hematológicos

Un examen completo de sangre nos brinda el número de eritrocitos por litro, la concentración de hemoglobina y el índice de glóbulos rojos. La anemia surge cuando la concentración de hemoglobina desciende por debajo de alrededor de los 130 g/L en los hombres, por debajo de los 120 g/L en las mujeres, y por debajo de los 110 g/L en las mujeres embarazadas. La deficiencia de hierro causa una anemia hipocrómica microcítica, y por ello, el tamaño celular (VCM), el contenido de hemoglobina (HCM), y la concentración de hemoglobina por célula (CMHC) se encuentran totalmente reducidos. El frotis de sangre periférica muestra una amplia variación en el tamaño, forma, y contenido de hemoglobina de los eritrocitos, con una gran proporción de células que son menores y más pálidas que las normales. Este cuadro tan definido no se presentará en los primeros estadios del agotamiento, cuando tanto la



concentración de hemoglobina como los índices de glóbulos rojos permanecen normales. La anemia hipocrómica microcítica es característica de la talasemia, anemia sideroblástica y anemia de enfermedad crónica, así como de deficiencia de hierro. Los parámetros de los glóbulos rojos definen de esta manera la presencia o ausencia de anemia y su carácter morfológico, pero se requiere de otras pruebas para identificar la causa de la anemia. Los estudios de los eritrocitos no contribuyen al diagnóstico de la hemocromatosis.

Hierro sérico (ver pág. 712, métodos)

La reserva del hierro circulante se recambia de 10 a 20 veces por día; de esta forma un átomo típico de hierro no está más de 2 horas en el plasma. Pueden ocurrir cambios súbitos en la concentración del hierro sérico de 20% o más aun en personas saludables, debido a los desbalances momentáneos en la entrada y salida de hierro. Existe una variación diurna, con una caída en la concentración del hierro por la noche; también ocurren variaciones significativas día tras día. Todos estos factores limitan la utilidad de diagnóstico de las mediciones de hierro sérico.

El intervalo de referencia para los hombres es de 650 a 1750 $\mu\text{g/L}$ y para las mujeres de 500 a 1700 $\mu\text{g/L}$. Las causas de los niveles anormales del hierro sérico están registradas en el cuadro de abajo.

Los valores del hierro sérico siempre deben ser interpretados en combinación con la saturación de la CTFH y de transferrina.

Cambios en el Hierro Sérico
Disminuido por: Deficiencia de Hierro Enfermedad crónica Neoplasia maligna Inflamación Pérdida reciente de sangre Menstruación
Aumentado por: Eritropoyesis inefectiva Anemia megaloblástica Talasemia principal Anemia sideroblástica Anemia hemolítica Anemia aplástica Hepatitis viral Hemocromatosis Intoxicación aguda por hierro

Capacidad de la fijación total de hierro (CTFH) y saturación de la transferrina (ver pág. 712, métodos)

La CTFH mide la cantidad máxima de hierro que las proteínas séricas pueden fijar y es



por lo tanto una manera indirecta de evaluar los niveles de transferrina. La transferrina puede también ser medida directamente por inmunoensayo y convertida a CTFH mediante la aplicación de una fórmula de conversión. La concentración de hierro en el suero dividido entre la CTFH da como resultado la saturación de la transferrina. El intervalo de referencia para la CTFH es de 2500 a 4500 $\mu\text{g/L}$ y la saturación de la transferrina es del 20% al 50% en los hombres y del 15% al 50% en las mujeres.

Las causas de los valores anormales de la CTFH están registradas en el cuadro de arriba a la derecha.

La baja concentración de hierro en el suero y el valor elevado de la CTFH en la deficiencia de hierro produce una baja saturación de la transferrina; los valores bajos pueden también verse en el embarazo y en la enfermedad crónica. Una saturación alta de la transferrina es característica del exceso de hierro y constituye una prueba sensible para la hemocromatosis. La talasemia principal, la anemia sideroblástica y la intoxicación por hierro también provocan un aumento en la saturación de la transferrina.

Cambios en la capacidad total de fijación de hierro (CTFH)
Disminuido por: Neoplasia maligna Inflamación Síndrome nefrótico Malnutrición Anemia megaloblástica y hemolítica Hemocromatosis
Aumentado por: Deficiencia de hierro Hepatitis Embarazo Uso de anticonceptivos orales

Ferritina sérica

En el plasma circula una pequeña cantidad de ferritina, la mayor parte como apoferritina libre de hierro. La ferritina circulante se encuentra en equilibrio con los depósitos de hierro y, en casi todas las circunstancias, refleja exactamente la cantidad de hierro almacenado presente. El intervalo de referencia es depende del inmunoensayo usado para medir la ferritina, pero es aproximadamente de 20 a 250 $\mu\text{g/L}$ en los hombres y de 10 a 120 $\mu\text{g/L}$ en las mujeres.

Una baja concentración de ferritina sérica es diagnóstico de deficiencia de hierro. Los niveles de ferritina caen al comienzo del desarrollo de la deficiencia de hierro, antes de que el hierro del suero y la saturación de la transferrina se tornen anormalmente bajos. La disponibilidad de esta confiable prueba sanguínea para la deficiencia de hierro ha eliminado la necesidad para la evaluación de la médula ósea en casi todos los casos. Un aumento de la ferritina sérica se observa cuando hay exceso de hierro, antes de que se desarrollen los signos y síntomas de hemocromatosis. Sin embargo, la liberación de ferritina de los tejidos dañados en la hepatitis, en las condiciones de inflamación aguda y en una variedad de tumores, aumenta también dramáticamente el nivel de ferritina sérica. En estas situaciones, los valores de ferritina normales pueden enmascarar la presencia de deficiencia de hierro, y por consiguiente,



para confirmar el diagnóstico puede requerirse de un examen de la médula ósea para hierro teñible.

Protoporfirina eritrocitaria libre

En el curso de la síntesis de hemo, un pequeño número de moléculas de protoporfirina escapan de la vía y no se acomplejan con el Fe^{2+} . La mayor parte de estas moléculas fijan Zn^{2+} en lugar de Fe^{++} para producir zinc protoporfirina, el cual luego se une al sitio hemo de la hemoglobina y circula en el eritrocito maduro. Los ensayos de las porfirinas eritrocitarias han incluido tradicionalmente un paso de extracción con ácido, el cual remueve el zinc y luego deja la protoporfirina libre de metal. De esta manera el término *protoporfirina eritrocitaria libre* (PEL) es realmente un nombre inapropiado. La medición de PEL indica la cantidad de protoporfirina sin hemo en los glóbulos rojos, constituyendo un parámetro clínico útil. Una información similar se obtiene por hematofluorometría, en la cual un solo instrumento mide tanto la protoporfirina con zinc (ZPP) como las concentraciones de hemo y expresa el resultado como una razón de los dos valores en $\mu\text{mol ZPP/mol}$ de hemo.

Una disminución en el hierro disponible para el desarrollo de los glóbulos rojos aumenta la formación de zinc protoporfirina. Tanto la deficiencia de hierro (falta absoluta de hierro) como la enfermedad crónica (utilización errónea de hierro) aumentarán la PEL. La protoporfiria, una deficiencia hereditaria de ferroquelatasa, se encuentra asociada a valores muy altos de la PEL.

El ensayo de la PEL es el más comúnmente utilizado como una prueba exploratoria para la deficiencia de hierro. Las mediciones de PEL han sido también utilizadas para detectar la intoxicación por plomo, pero ya no se considera lo suficientemente sensible y están siendo reemplazadas por medición directa de plomo en sangre. Cuando se desarrolla con un hematofluorómetro, la prueba es rápida, técnicamente simple, reproducible, y requiere solamente de una gota de sangre, haciéndola especialmente útil en los niños. Una relación creciente de PEL o ZPP/hemo debe ser seguida de pruebas más específicas del estado de hierro.

Parte II: Síntesis de Hemo y las Porfirias

Estructura y Función

Todas las porfirinas contienen un núcleo de cuatro unidades pirrólicas unidas por puentes metenilos ($=\text{CH}-$) dentro de una estructura de anillo macrocíclico (Fig. 35-2). La red extendida de uniones simples y dobles hacen que las porfirinas absorban luz visible; es este grupo el que le da el color rojo a la hemoglobina. Las porfirinas también fluorescen de un color rosado rojizo, bajo una luz de longitud de onda ultravioleta, una propiedad que es útil cuando se detecta y mide porfirinas en los fluidos corporales. Otra propiedad única es el arreglo de cuatro átomos de nitrógeno en el centro del anillo, permitiendo a las moléculas de porfirina quelar átomos de metal. En los sistemas biológicos, el hierro es el metal más importante que se acompleja con las porfirinas.

Las diferencias en la estructura de las porfirinas dependen del tipo y posición de las



cadena laterales localizadas en los vértices de los anillos pirrólicos. En los humanos, existen tres porfirinas principales: la uroporfirina (URO), la coproporfirina (COPRO) y la protoporfirina (PROTO) (Figs. 35-3 y 35-4). URO tiene como cadenas laterales cuatro propionatos y cuatro acetatos, mientras que COPRO tiene como cadenas laterales cuatro propionatos y cuatro metilos. Estos grupos pueden ser ordenados en cuatro configuraciones estructurales diferentes, de las cuales el isómero tipo III es el que se produce. PROTO tiene dos propionatos, dos vinilos y cuatro grupos metilos que pueden ordenarse en cualquiera de las 15 diferentes configuraciones. Solamente el isómero tipo IX es producido en el cuerpo.

Las porfirinas libres son productos de la vía sintética del hemo y no presentan función biológica por sí mismas. El hemo, el quelato de hierro de la protoporfirina, es el grupo prostético para muchas proteínas y enzimas involucradas en el metabolismo del oxígeno y en las reacciones de transferencia electrónica (ver Tabla 35-1). También existen naturalmente cantidades traza de protoporfirina de zinc, pero no se le ha asignado ninguna función fisiológica a este compuesto.

Bioquímica

La síntesis del hemo se realiza en todas las células pero ocurre en su mayor parte en la médula ósea (los precursores de los glóbulos rojos) y el hígado. Es útil considerar la vía en dos partes: (1) formación de la estructura de anillo por condensaciones repetidas de los precursores (Fig. 35-3) y (2) modificación de las cadenas laterales e inserción del hierro (Fig. 35-4). Esta división arbitraria simplifica lo que de otra manera sería una serie de reacciones larga y compleja.

Vía sintética

La vía sintética comienza con la condensación de succinil CoA y glicina, activada por fosfato de piridoxal, para formar ácido delta aminolevulínico (más conocido por su acrónimo en inglés, ALA). Esta reacción, catalizada por la ALA sintasa, es el paso limitante de reacción en la síntesis del hemo. Dos moléculas de ALA se condensan luego para formar porfobilinógeno (PBG), un pirrol con cadenas laterales de propionato y acetato en sus vértices. Luego, cuatro moléculas de PBG se condensan en una configuración cabeza con cola para formar un tetrapirrol lineal, el hidroximetilbilano que se cicliz para formar uroporfirinógeno. Este es un paso crítico en el que uno de los pirroles debe cambiar la orientación de sus cadenas laterales de propionato y acetato para producir el isómero tipo III de uroporfirinógeno. La porfobilinógeno desaminasa cataliza la reacción de condensación, pero la uroporfirinógeno III cosintasa realiza la isomerización de una unidad pirrólica.

En este punto la estructura básica de anillo está terminada. La modificación de las cadenas laterales comienza con la descarboxilación de cuatro grupos acetato para formar coproporfirinógeno III. Dos grupos propionato son entonces descarboxilados y deshidrogenados a grupos vinilos, produciendo protoporfirinógeno IX. Los átomos de carbono que sirven como puente son oxidados pasando de metileno ($-\text{CH}_2-$) a metenilo ($=\text{CH}-$) para producir protoporfirina IX. En el paso final, el Fe^{2+} es insertado dentro del anillo de protoporfirina para producir el hemo.

Dentro del hígado, la síntesis de hemo está controlada primeramente por cambios en la



actividad de la ALA sintasa, la primera enzima y además la limitante de reacción. Pequeñas cantidades de hemo libre están presentes dentro de las células hepáticas. Un aumento en esta reserva celular inhibe la actividad de la ALA sintasa, mientras que una disminución estimula a la enzima. La regulación de la síntesis de hemo en los precursores de los glóbulos rojos parece involucrar a otras enzimas dentro de la vía como así también a la velocidad de la incorporación celular de hierro.

Puntos de interés

Varios aspectos de la síntesis de porfirina merecen una firme atención. Dos enzimas, la ALA deshidratasa y la ferroquelatasa, son inhibidas por el plomo, resultando en el aumento de sus respectivos sustratos (ALA y protoporfirina IX) en la intoxicación por plomo. Otra enzima interesante es la uroporfirinógeno III cosintasa, la cual produce el isómero tipo II de uroporfirinógeno durante el paso de ciclización del anillo. Sin esta enzima solamente se forma el isómero tipo I, el cual no es un precursor del grupo hemo.

Note también que durante la última mitad de la vía se forman intermediarios de porfirinógeno. Los porfirinógenos difieren de las porfirinas en que los átomos de carbono que forman el puente están completamente reducidos, y los cuatro átomos de nitrógeno se encuentran todos protonados. No existe un sistema para alternar los dobles y simples enlaces y por lo tanto estos compuestos son incoloros y no presentan fluorescencia. Los porfirinógenos que no se usan en la vía regular, se oxidan espontáneamente y reversiblemente a las porfirinas correspondientes. Esta es la razón de que URO, COPRO y PROTO son las principales formas de excreción, y no los porfirinógenos.

Finalmente, la vía de las porfirinas comienza y termina en la mitocondria, pero cuatro de los pasos involucrados tienen lugar en el citosol. La distribución intracelular de las enzimas se muestra en la Fig. 35-5. Debido a que los eritrocitos pierden sus mitocondrias a medida que maduran, solamente la mitad de estas enzimas pueden ser analizadas en los glóbulos rojos circulantes.

Condiciones Patológicas

¿Qué sucedería si las enzimas involucradas en la síntesis de hemo no funcionan correctamente? La respuesta a esta pregunta puede encontrarse en el estudio de las porfirias, un grupo de trastornos de la síntesis de hemo genéticamente determinados. Cinco de las porfirias son hereditarias como un rasgo autosómico dominante. Debido a que el paciente tiene un único gen para producir una enzima funcional, hay alrededor de un 50% de actividad enzimática normal. Este defecto parcial no causa una deficiencia de hemo en los glóbulos rojos, y por ello los pacientes no desarrollan anemia. Sin embargo, las porfirinas y sus precursores se producen debido a la enzima deficiente y se acumulan en los tejidos y fluidos corporales. Las propiedades fotosensibilizadoras de las porfirinas son responsables de los signos cutáneos y de los síntomas observados en los pacientes con estos trastornos.

La excreción del exceso de porfirinas y sus precursores es la base para diagnosticar las porfirias. La ruta de excreción es una función de la solubilidad. La URO, con ocho grupos carboxilos, es la más soluble y se excreta casi en su totalidad en la orina. La PROTO, con sólo dos grupos carboxilos, es excretada exclusivamente en las heces. La COPRO, que tiene cuatro



grupos carboxilos, es excretada por cualquier ruta. Los precursores de la porfirina ALA y PBG son ambos solubles en agua y eliminados en la orina.

Tradicionalmente las porfirias han sido clasificadas como eritropoyéticas o hepáticas, basadas en el sitio de sobreproducción de las porfirinas y de sus precursores. Una enfoque más útil es la clasificación de las porfirias por los signos y síntomas (neurológicos versus cutáneos), ya que esto nos permite pensar en términos de su presentación clínica.

Porfirias neurológicas

Existen tres porfirias caracterizadas por ataques agudos y dolor abdominal, signos neuromusculares y disturbios psiquiátricos. Los ataques agudos, los cuales pueden durar de días a semanas, están acompañados por un aumento en la excreción de ALA y PBG en la orina. A pesar de la asociación de niveles aumentados de los precursores de porfirina con los ataques, su base bioquímica permanece desconocida. No ha sido claramente demostrada que el ALA o el PBG causen neurotoxicidad. El ALA es un análogo estructural del ácido gama aminobutírico y, en altas concentraciones, podría imitar o interferir con las acciones de este neurotransmisor. Otra teoría sostiene que la deficiencia de hemo dentro de las células nerviosas es la responsable de los ataques. Cada defecto enzimático es heredado como un rasgo autosómico dominante.

Los signos y síntomas de las porfirias neurológicas generalmente comienzan durante la adolescencia o temprano en la edad adulta y afecta más a las mujeres que a los hombres. El dolor abdominal es el hallazgo más constante y se encuentra frecuentemente acompañado por constipación, náusea y vómitos. Las anomalías del sistema nervioso autónomo incluyen taquicardia, hipertensión, sudor y retención urinaria. La neuropatía periférica puede ser expresada como dolor en las extremidades, áreas de sensación reducida o alterada, debilidad muscular, y parálisis. También pueden ocurrir disturbios visuales, accesos, y coma, así como secreción inapropiada de hormona antidiurética que puede contribuir a una concentración baja de sodio sérico. Algunos pacientes tienen una historia de nerviosismo, desórdenes del carácter, o pensamientos negativos, lo que sugiere una enfermedad psiquiátrica primaria.

Los ataques agudos pueden ser precipitados por la acción de varias drogas, principalmente los barbitúricos y las sulfonamidas. El ayuno o la dieta pueden precipitar un ataque, y los pacientes necesitan mantener una entrada adecuada de calorías. El consumo de alcohol y de hormonas esteroideas (como los anticonceptivos orales) están también asociados a los ataques. Durante el intervalo entre los ataques, se encuentran ausentes los signos y síntomas de porfiria. La mayoría de los portadores del gen para una de estas porfirias nunca presentan un ataque, y su enfermedad permanece clínicamente latente.

Los únicos rasgos de cada porfiria neurológica son revisados adelante y en la Tabla 35-3.

Porfiria aguda intermitente.

La porfiria aguda intermitente es la más común de las porfirias neurológicas con una prevalencia estimada de 1 a 10 por cada 100,000 personas. Los pacientes con esta enfermedad tienen una deficiencia de un 50% de la porfobilinógeno desaminasa. El defecto provoca que el ALA y PBG se acumulen por bloqueo de la enzima, y la interrupción parcial de la vía induce la actividad de la ALA sintasa. De esta manera, ALA y PBG son excretados en grandes cantidades en esta porfiria. Debido a que el defecto no involucra la porción de



porfirinógeno de la vía, las porfirinas no son producidas en exceso, y no ocurre fotosensibilidad.

El principal hallazgo del diagnóstico de laboratorio es un aumento en las concentraciones de ALA y PBG urinarios durante los ataques agudos. Sin embargo, en el lapso entre los ataques sus valores pueden revertirse a valores normales. Cuando el PBG se encuentra presente a altas concentraciones en la orina, se condensa espontáneamente y se cicliziza para formar uroporfirinógeno, el cual luego se oxida a URO. Grandes aumentos en URO pueden estar presentes en cualquiera de las porfirias neurológicas, particularmente en la porfiria aguda intermitente. En contraste, las porfirinas fecales son normales. La porfobilinógeno desaminasa puede analizarse en los eritrocitos y generalmente está disminuida en alrededor del 50% del valor normal, cuando el paciente se encuentra críticamente enfermo o si tiene la forma latente sin expresar.

Porfiria variegata.

Los pacientes con porfiria variegata sufren de ataques agudos y sensibilidad de la piel tanto a la luz solar como al trauma mecánico. El defecto enzimático es una deficiencia parcial de la protoporfirinógeno oxidasa. Tanto PROTO como COPRO se acumulan en el cuerpo, dando lugar a fotosensibilidad y lesiones cutáneas. Es la enfermedad más común entre los blancos sudafricanos y fue detectada en una pareja que emigró de Holanda en 1688. En una nota histórica interesante pero no probada, varios autores han especulado que el Rey Jorge III de Inglaterra sufría de porfiria variegata.

Coproporfiria.

Una deficiencia parcial de coproporfirinógeno oxidasa en esta enfermedad hace que se acumule las COPRO. Además de los ataques agudos, pueden ocurrir fotosensibilidad y lesiones en la piel, aunque no tan a menudo como en la porfiria variegata. Los niveles urinarios de ALA y PBG se encuentran aumentados durante los ataques agudos. El hallazgo diagnóstico clave es un aumento en la excreción fecal de COPRO.

Deficiencia de ALA deshidratasa.

Se han descrito varios pacientes con una deficiencia casi completa de ALA deshidratasa. Los homocigotos presentan síntomas neurológicos pero no fotosensibilidad; los heterocigotos son asintomáticos. Los hallazgos de laboratorio son la excreción aumentada de ALA y COPRO en la orina.

Porfirias cutáneas

Las tres porfirias cutáneas tienen en común un exceso de porfirinas en los tejidos corporales, incluyendo la piel. Las moléculas de porfirina absorben la luz a alrededor de 400 nm, lo que eleva los electrones a un estado energético más alto. A medida que los electrones retornan a su estado basal, parte de la energía que ellos liberan puede ser transferida a la molécula de oxígeno, generando una especie de oxígeno excitado que puede atacar los constituyentes celulares. Estas reacciones a nivel molecular y celular se traducen finalmente en fotosensibilidad y en lesiones de la piel.

En las porfirias cutáneas, ALA y PBG no se excretan en exceso como es en el caso de las porfirias neurológicas, y no se encuentran presentes signos o síntomas neurológicos. Se

debe recordar que las dos porfirias neurológicas en las que se acumulan las porfirinas (variegata y coproporfiria) también pueden presentar manifestaciones en la piel. Cada una de las porfirias cutáneas se discuten brevemente más abajo y son revisadas en la Tabla 35-3.

Porfiria cutánea tardía.

La porfiria cutánea tardía es un trastorno de la piel que no aparece generalmente hasta la edad adulta. Es el tipo más común de porfiria y es causada por una deficiencia parcial de uroporfirinógeno decarboxilasa. Algunos casos de la enfermedad son claramente familiares y se heredan como un rasgo autosómico dominante, pero la mayoría de los casos son esporádicos y probablemente representan una deficiencia adquirida de la enzima hepática. Los signos y síntomas de esta enfermedad incluyen piel frágil, formación de ampollas, engrosamiento y cicatriz en forma de anillo por exposición al sol, y áreas de hiperpigmentación. La enfermedad permanece sin manifestarse hasta que se desarrolla alguna forma de disfunción del hígado, como un exceso de hierro hepático o enfermedad alcohólica del hígado. La terapia con estrógenos puede también activar la enfermedad. La forma rara homocigota de esta enfermedad, llamada porfiria hepatoeritropoyética, produce fotosensibilidad severa.

La deficiencia de uroporfironógeno decarboxilasa causa la producción de URO así como acumulación de 7-, 6-, y 5- carboxil porfirinas, y sus concentraciones en la orina se encuentran extremadamente aumentadas. Las porfirinas fecales están solamente moderadamente elevadas, pero la presencia de isocoproporfirina, la cual es un isómero de COPRO, es característica de esta porfiria. Las porfirinas de los glóbulos rojos se encuentran dentro del intervalo de referencia.

Protoporfiria.

En la protoporfiria existe una deficiencia parcial de ferroquelatasa, la última enzima en la vía sintética del hemo. La acumulación resultante de PROTO causa fotosensibilidad al comienzo de la niñez o en la adolescencia. Cuando los pacientes se exponen a la luz solar, ellos desarrollan quemaduras, sarna, sudor, y piel rojiza. Las áreas expuestas al sol como las manos y la cara son las afectadas, pero los cambios en la piel son moderados y las manchas no son comunes. Una minoría de los pacientes desarrollan enfermedad de hígado o piedras biliares que contienen protoporfirina, ya que el hígado se halla involucrado en la excreción de grandes cantidades inusuales de PROTO.

La concentración de protoporfirina eritrocitaria libre está muy elevada. La PROTO fecal está también generalmente aumentada, aunque la magnitud del aumento es variable. Las porfirinas urinarias y sus precursores son normales.

Porfiria eritropoyética congénita.

La porfiria eritropoyética congénita es un trastorno autosómico recesivo raro causado por deficiencia de la uroporfirinógeno III cosintasa. El defecto de la enzima no es completo, y se sintetiza suficiente uroporfironógeno II para hacer frente a las necesidades metabólicas. Sin embargo, grandes cantidades de la serie de isómeros tipo I son producidas también y son oxidados eventualmente para formar URO I y COPRO I. La enfermedad generalmente se presenta al comienzo de la niñez con fotosensibilidad extrema. Las áreas de la piel expuestas a la luz se tornan manchadas y a medida que los pacientes crecen, pueden ocurrir manchas



extensivas y mutilación de los dedos, nariz y ojos. Un hallazgo único de la enfermedad es la *eritrodoncia*, la coloración marrón rojiza de los dientes causada por depósito de porfirina. Los pacientes también desarrollan anemia hemolítica y engrosamiento del bazo. De todas las porfirias, ésta es la de peor pronóstico.

Los pacientes excretan orina rosada o roja debido a las cantidades masivas de URO y COPRO presentes. Los glóbulos rojos contienen grandes cantidades de URO y COPRO y fluorescen cuando son examinados microscópicamente bajo la luz ultravioleta. Las porfirinas fecales se encuentran también aumentadas.

Trastornos secundarios del metabolismo de las porfirinas

Las alteraciones en el metabolismo y excreción de las porfirinas pueden ocurrir en situaciones diferentes a las de las porfirias. Varios trastornos comunes se describen adelante.

Intoxicación por plomo.

El envenenamiento por plomo puede ocurrir en los niños pequeños cuando comen restos de pintura con plomo o en los adultos que se encuentran expuestos a los compuestos con plomo en un ambiente industrial o quienes beben whisky ilegalmente destilado con un equipo que contiene plomo. Los signos y síntomas incluyen dolor abdominal y anormalidades neurológicas que pueden imitar un ataque agudo de porfiria. El plomo inhibe a dos enzimas en la vía de las porfirinas: la ALA deshidratasa y la ferroquelatasa. Consecuentemente, hay un aumento en la ALA urinaria (pero *no* de PBG) y en la concentración eritrocitaria de protoporfirina de zinc; el nivel de COPRO urinaria se encuentra también aumentado. Aunque estos hallazgos son típicos de la intoxicación por plomo, el diagnóstico está basado en la demostración de las concentraciones aumentadas de plomo en la sangre total.

Deficiencia de hierro.

Los pacientes con deficiencia de hierro tienen un desbalance entre la protoporfirina que es producida en cantidades normales, y el hierro, el cual no está disponible para la síntesis de hemo. Como resultado, la protoporfirina de zinc se acumula en los glóbulos rojos por encima de los valores normales. Debido a que es una condición tan difundida, la deficiencia de hierro es la causa más común de las porfirinas aumentadas de los eritrocitos. Las condiciones que disminuyen la disponibilidad de hierro, como la inflamación aguda o crónica, también aumentan las porfirinas de los glóbulos rojos. La medición de protoporfirina de zinc es una prueba exploratoria útil para la deficiencia de hierro, pero el diagnóstico es confirmado por medio de estudios de hierro sérico, capacidad total de fijación de hierro, y ferritina.

Coproporfinuria.

Un aumento aislado en COPRO urinaria es el hallazgo anormal más común cuando se analiza la orina para las porfirinas. Aun cuando este hallazgo puede indicar una porfiria, es causado más a menudo por problemas no relacionados con la síntesis de hierro, como la enfermedad del hígado, enfermedad aguda o exposición a compuestos tóxicos. Un pequeño aumento aislado (menor del doble) en la COPRO urinaria es generalmente un hallazgo no específico de limitado valor diagnóstico.

Cambio del Compuesto Analizado en la Enfermedad



La preparación del trabajo de laboratorio para el análisis una preesunta porfiria depende de la presentación clínica. Para las porfirias neurológicas, el análisis de las muestras de orina y de heces es suficiente para realizar un diagnóstico. Las porfirias cutáneas son diagnosticadas a través del análisis de orina, eritrocitos, y de porfirinas fecales. Como una regla, las pruebas de exploración son usadas para identificar aumentos en PBG y en las porfirinas urinarias y fecales. Las pruebas exploratorias positivas deben confirmarse por mediciones cuantitativas en una muestra de orina de 24 horas o en muestras fecales al azar, así como por identificación de cuáles porfirinas se encuentran elevadas. Las pruebas exploratorias negativas no requieren análisis posteriores.

La interpretación de los resultados es complicada debido a varios factores. En las pruebas exploratorias tradicionales, las porfirinas son extraídas en un solvente orgánico acidificado, y un resultado positivo se indica por una fluorescencia rojiza del extracto usando luz ultravioleta de longitud de onda larga. La prueba exploratoria para PBG se basa en su reacción con el *p*-dimetilaminobenzaldehído para formar un compuesto rojizo púrpura. Ambas técnicas requieren un juicio subjetivo que considere hasta dónde se forma el color esperado, y pueden dar resultados falsos positivos o falsos negativos debido a la existencia en la orina y heces de sustancias interferentes. Las pruebas de exploración más recientes, basadas en espectrofotometría y spectrofluorometría, han eliminado estas interferencias y proporcionan un valor numérico para la cantidad de PBG o de porfirina que se encuentra presente en la muestra.

Otro problema es la excreción variable de porfirinas y de sus precursores en condiciones de salud y enfermedad. Las porfirinas urinarias, fecales y eritrocitarias se encuentran típicamente aumentadas de cinco a diez veces en los pacientes con porfiria. Lo mismo sucede para ALA y PBG en la fase aguda de la porfiria neurológica. Sin embargo, algunos compuestos analizados, principalmente ALA y PBG, se encuentran afectados por la actividad de la enfermedad que está ocurriendo, y el rango de valores observados en cualquiera de las porfirias puede variar demasiado. En personas que no presentan una porfiria pueden ocurrir también aumentos aislados de las porfirinas en la orina (< dos veces), en las heces (< tres veces), y en los glóbulos rojos (< cinco veces). Por estas razones, el diagnóstico debe basarse en una combinación de la presentación clínica, técnicas analíticas confiables e interpretación cuidadosa de los resultados de las pruebas.

Los hallazgos clave de laboratorio en las porfirias se encuentran resumidos en la Tabla 35-4.

Porfobilinógeno (PBG)

El porfobilinógeno urinario se encuentra elevado en la porfiria intermitente aguda, porfiria variegata, y en la coproporfiria. La prueba exploratoria para el PBG es positiva durante los ataques agudos pero puede ser negativa entre los ataques. Una prueba exploratoria positiva es confirmada por un análisis cuantitativo de PBG, realizado en una toma de orina de 24 horas. El intervalo de referencia es 2 mg/día.

Acido delta aminolevulínico (ALA)

Los valores urinarios de ALA se asemejan al aumento en el PBG visto en las tres porfirias neurológicas. También se encuentra elevado en la intoxicación por plomo y en la



tirosinemia hereditaria y por lo tanto es un indicador menos específico para porfiria que para PBG. Las mediciones son realizadas en las tomas de orina de 24 horas, y el intervalo de referencia es de 1.5 a 7.5 mg/día.

Porfirinas urinarias

Las pruebas exploratorias para las porfirinas urinarias son generalmente positivas en todas las porfirias excepto en la protoporfiria y en la fase latente de la porfiria intermitente aguda. Los resultados exploratorios positivos de orina son seguidos de la identificación de porfirina (URO o COPRO, o ambas), la cual es elevada. Una elevación de leve a moderada de la concentración urinaria de COPRO se observa en la enfermedad hepática, intoxicación por plomo, ingestión de alcohol, y enfermedad aguda. Los grandes aumentos, especialmente en las concentraciones de URO, requieren de un análisis cuantitativo de una toma de orina de 24 horas. Los intervalos de referencia son de ≤ 50 $\mu\text{g/día}$ para URO y de ≤ 230 $\mu\text{g/día}$ para COPRO.

Los pacientes con porfiria eritropoyética congénita excretan enormes cantidades de URO y COPRO. En la porfiria cutánea tardía, se observa excreción de URO y de una 7-carboxilo porfirina distintiva con pequeñas cantidades de 6- y 5- carboxil porfirinas y de COPRO, que dependen de la actividad presente de la enfermedad. La porfiria variegata y la coproporfiria se encuentran caracterizadas por un exceso de COPRO en la orina. Los pacientes con porfiria intermitente aguda algunas veces excretan niveles altos de URO debido a la condensación no enzimática de moléculas de PBG en la orina. El URO puede encontrarse aumentado en las otras dos porfirias neurológicas por la misma razón.

Porfirinas fecales

Las porfirinas fecales consisten de COPRO, PROTO y varias otras porfirinas dicarboxílicas (meso-, deuterio-, y pemptoporfirina). La cantidad de porfirinas excretadas por esta ruta es una función de la dieta y de la flora anaerobia del colon. Por consiguiente, pueden ser observados en los individuos saludables aumentos en la excreción de porfirina fecal tres veces por encima del límite de referencia. Los intervalos de referencia son ≤ 30 $\mu\text{g/g}$ de peso seco para COPRO y ≤ 60 $\mu\text{g/g}$ de peso húmedo para PROTO.

Las porfirinas fecales se encuentran generalmente aumentadas en todas las porfirias excepto en la porfiria intermitente aguda. Una prueba exploratoria positiva para las porfirinas fecales debe ser seguido por un análisis para determinar cuáles son las porfirinas elevadas. La aplicación más importante de esta prueba es distinguir la porfiria variegata (ambas PROTO y COPRO elevadas) de la coproporfiria (solamente COPRO elevada). Un aumento en PROTO se observa también en la protoporfiria, mientras que los pacientes con porfiria eritropoyética congénita excretan grandes cantidades de COPRO. Las porfirinas fecales pueden encontrarse dentro del intervalo de referencia o solamente ligeramente aumentadas en la porfiria cutánea tardía, pero el fraccionamiento muestra un rango de porfirinas, incluyendo URO, 7-carboxil porfirina, y isocoproporfirina, que no es observado normalmente en las heces.

Porfirinas eritrocitarias

La concentración de las porfirinas de los glóbulos rojos, medida como protoporfirina eritrocitaria libre (PEL), se encuentra muy aumentada en la porfiria eritropoyética congénita (URO y COPRO) y en la protoporfiria (PROTO) pero es normal en las otras porfirias. El



fraccionamiento de las porfirinas eritrocitarias no es necesario, debido a que estos dos trastornos pueden diferenciarse por medio de los análisis de la porfirina urinaria y por la presentación clínica. Como se mencionó previamente, la PEL se encuentra también aumentada en la deficiencia por hierro y en la intoxicación por plomo. El intervalo de referencia para PEL es de 170 a 770 $\mu\text{g/L}$ de eritrocitos.

Ensayos enzimáticos

Solamente una enzima de la vía del hemo, la porfobilinógeno desaminasa, es medida rutinariamente por los laboratorios clínicos. Su actividad está disminuida en alrededor de un 50% del valor normal en los glóbulos rojos para la mayor parte de los individuos con porfiria aguda intermitente, ya sea que la enfermedad es latente o que se encuentre en una fase aguda. La utilidad de este ensayo se encuentra disminuida por dos factores. Primero, hay un traslape de valores entre pacientes e individuos saludables en el límite más bajo del intervalo de referencia. Segundo, un pequeño grupo de pacientes con la enfermedad presenta actividad normal de la PBG desaminasa en los eritrocitos, causada por mutaciones en el gen que no afectan la expresión de la enzima en los glóbulos rojos. A pesar de sus defectos, la PBG desaminasa es frecuentemente la única prueba que puede identificar los individuos asintomáticos que llevan el gen para la porfiria intermitente aguda.

Genética molecular

La mayor parte de los genes que codifican enzimas para la vía sintética del hemo ha sido actualmente identificada y dichos genes están al menos, parcialmente secuenciados. Este trabajo ha conducido al descubrimiento de mutaciones que causan porfiria aguda intermitente, coproporfiria, porfiria cutánea tardía, protoporfiria y porfiria eritropoyética congénita. Una vez que se defina más completamente la base molecular para las porfirias, será posible realizar las pruebas exactas de estos trastornos con los ensayos basados en el DNA.

Parte III: Bilirrubina

Formación y Estructura

El grupo hemo es degradado en las células del sistema retículoendotelial (Fig. 35-6). La hemo oxigenasa, en presencia de oxígeno molecular y de NADPH, abre el anillo de protoporfirina para liberar el ion hierro, monóxido de carbono, y un tetrapirrol lineal, la biliverdina. El hierro es reciclado para la síntesis futura del hemo, y el monóxido de carbono es excretado por los pulmones. La biliverdina es metabolizada en un paso posterior: el doble enlace en el centro de la molécula es reducido para formar bilirrubina. Este pigmento amarillo anaranjado es el mayor producto de desecho del metabolismo del hemo.

La estructura de la bilirrubina aparece en la Fig. 27-8 pág. 525. La molécula consiste de dos mitades casi idénticas unidas por un grupo $-\text{CH}_2-$ en su centro. Debido a que el carbono central se encuentra totalmente saturado, existe libre rotación alrededor de sus enlaces. Esto capacita a los grupos polares para formar puentes de hidrógeno idénticos, dejando un exterior hidrofóbico en la molécula. Los dobles enlaces entre el carbono 4 y el carbono 5 en una parte de la molécula y el carbono 15 y el 16 en otra, se encuentran



normalmente en la posición trans, o “Z”. Al exponerse a la luz, cualquiera de estos dobles enlaces puede girar a la configuración cis, o “E”, por lo tanto forma isómeros E-Z, Z-E o E-E. La configuración E interfiere con los puentes de hidrógenos internos y la molécula se torna más polar.

La estructura química de la bilirrubina explica su solubilidad extremadamente baja en soluciones acuosas. Proporciona también una razón para el tratamiento de los niños con ictericia por medio de la fototerapia, ya que los fotoisómeros de la bilirrubina son más polares y pueden ser excretados directamente en la bilis sin necesidad de conjugación.

Metabolismo

Producción

La ruptura de las proteínas que contienen hemo genera alrededor de 250 a 300 mg de bilirrubina por día. Aproximadamente 80% a 85% de la bilirrubina deriva de la hemoglobina de los eritrocitos maduros. La mayor parte de los eritrocitos es destruida dentro de las células retículoendoteliales, principalmente en el bazo. Un pequeño porcentaje de los eritrocitos es igualmente destruido dentro del sistema circulatorio. La bilirrubina restante, de 15 a 20%, proviene de la destrucción de los precursores de los eritrocitos en la médula ósea y del recambio de las hemoproteínas en otros tejidos.

Transporte

Una vez que la bilirrubina es liberada en el plasma, se une muy fuertemente a la albúmina. Cada molécula de albúmina tiene un sitio de alta afinidad para la bilirrubina y uno o dos sitios de afinidad más débiles. El transporte de la bilirrubina en su estado unido evita que pase a través de las membranas celulares y los tejidos entéricos, en donde ejercería efectos tóxicos. Ciertos fármacos de tipo aniónico como los antibióticos sulfonamidas, barbitúricos, y salicilatos, así como ácidos grasos libres, compiten por los sitios de unión de la bilirrubina en la albúmina. Generalmente esto no es un problema en los adultos, pero los niños presentan una capacidad de unión menor para la bilirrubina. En presencia de sustancias competidoras, la bilirrubina puede estar separada de la albúmina, cruzar la barrera hematoencefálica, y entrar en las células cerebrales, para causar *kernicterus*.

Además de la unión reversible usual, la bilirrubina puede también unirse covalentemente a la albúmina en pacientes con excreción hepática alterada de la bilirrubina. La forma covalentemente unida, *delta bilirrubina*, continúa circulando con su transportador albúmina hasta que ésta es removida de la circulación. Todavía se desconoce el mecanismo de unión y propósito fisiológico de la delta bilirrubina.

Incorporación hepática, conjugación y excreción

Durante el paso a través de la microcirculación del hígado, la albúmina libera la bilirrubina a los hepatocitos (Fig. 35-7). Después que la bilirrubina difunde a través de la membrana celular, se une principalmente a la *ligandina*, una proteína citosólica que se une a aniones orgánicos. La ligandina no parece estar involucrada en la incorporación celular de la bilirrubina. Su función es probablemente evitar la difusión de la bilirrubina hacia fuera del hepatocito o hacia adentro de otros compartimentos celulares.

En el retículo endoplásmico, los residuos de ácido glucorónicos son agregados a las cadenas laterales de propionato de la bilirrubina. La reacción es catalizada por la bilirrubina



UDP glucoronil transferasa, y el ácido UDP glucorónico es el donador del carbohidrato. La adición de residuos de azúcar aumenta la solubilidad de la bilirrubina en agua de manera de que pueda ser excretada al sistema biliar. Alrededor del 85% al 90% de la bilirrubina aparece en la bilis como diglucorónido y alrededor del 10% al 15% aparece como monoglucorónido. En la bilis también se encuentran pequeñas cantidades de otros conjugados bilirrubina-azúcar (glucósidos, xilósidos) así como bilirrubina libre (fotoisómeros solubles en agua). La excreción en la bilis es el paso limitante en el metabolismo hepático de la bilirrubina. Es un proceso dependiente de energía en el cual la bilirrubina es transportada en contra de un gradiente de concentración.

Tránsito intestinal

Después de la excreción en la bilis, la bilirrubina conjugada pasa a través de los conductos hepáticos y biliares comunes y dentro del lumen intestinal. En el intestino delgado distal y en el colon, las bacterias anaeróbicas hidrolizan los residuos de ácido glucorónico y reducen la bilirrubina a una variedad de compuestos conocidos colectivamente como *urobilinógenos*. A diferencia del glucorónido de bilirrubina, que es más polar, los urobilinógenos pueden ser reabsorbidos por el intestino y retornados al hígado por medio de la circulación portal. Más del 90% de los urobilinógenos recirculados son tomados por las células del hígado y reexcretados en la bilis; los restantes son filtrados por los riñones y excretados en la orina. Los urobilinógenos son incoloros, pero en presencia de aire se oxidan espontáneamente a las correspondientes urobilinas. Estos compuestos coloreados contribuyen al color normal de las heces y la orina.

Condiciones Patológicas: Hiperbilirrubinemia

Las enfermedades o condiciones que interfieren con el metabolismo de la bilirrubina pueden causar un aumento en su concentración sérica. La ictericia, una decoloración amarillenta de la esclerótica y de la piel, aparece cuando la concentración de la bilirrubina del suero llega a alrededor de 25mg/L. Por sí sola, la hiperbilirrubinemia no es una amenaza para la salud, ya que existen mecanismos adecuados para la fijación y la detoxificación de la bilirrubina. Sin embargo, la hiperbilirrubinemia sí indica una anomalía en la producción o metabolismo subsecuente de la bilirrubina.

Existen cinco mecanismos que pueden conducir a hiperbilirrubinemia e ictericia:

1. Sobreproducción
2. Mala asimilación por las células del hígado
3. Defectos en la reacción de conjugación
4. Excreción reducida dentro de la bilis
5. Obstrucción del flujo biliar

El primero de los tres mecanismos causa un aumento en la bilirrubina conjugada sérica, mientras que los dos últimos mecanismos producen un aumento de ambas bilirrubinas séricas, conjugada y no conjugada. Para una ilustración de los mecanismos de la hiperbilirrubinemia vea la pág. 511.



Sobreproducción

La producción aumentada de bilirrubina es generalmente el resultado de una ruptura acelerada de los glóbulos rojos. Cuando la velocidad de hemólisis excede la capacidad de hígado para tomar bilirrubina a partir de la sangre, el paciente desarrolla hiperbilirrubinemia. La bilirrubina del suero no excede generalmente los 50mg/L en los estados hemolíticos, y la bilirrubina se encuentra en su mayor parte no conjugada. En las anemias hemolíticas crónicas tales como la enfermedad de la célula falciforme o la esferocitosis hereditaria, la sobreproducción prolongada de bilirrubina puede conducir a la formación de cálculos biliares que contengan bilirrubina. La eritropoyesis inefectiva, que ocurre en la talasemia, anemia perniciosa, y otros desórdenes, causa un aumento similar en la producción de bilirrubina.

Incorporación alterada

La fase hepática del metabolismo de la bilirrubina comienza con su asimilación por las células del hígado. Varios fármacos interfieren con este proceso, posiblemente compitiendo con la bilirrubina por unión a la ligandina. El *síndrome de Gilbert* es una alteración hereditaria caracterizado por un pequeño aumento en la bilirrubina sérica sin conjugar. Algunos casos parecen involucrar un defecto en la incorporación hepática, pero es más común que exista una deficiencia parcial de la enzima esterificante glucoroniltransferasa. El grado de hiperbilirrubinemia en los pacientes con síndrome de Gilbert es variable; se agrava debida un ayuno prolongado. No existen otros signos, síntomas, o anormalidades de laboratorio, y el pronóstico es excelente.

Conjugación defectuosa

Los defectos en la reacción de conjugación pueden ser hereditarios, adquiridos, o debidos al desarrollo. La deficiencia hereditaria de la enzima esterificante se conoce como el *síndrome de Crigler-Najjar*. En el desorden raro de tipo I, existe una ausencia completa de actividad de glucoroniltransferasa. Los niveles de bilirrubina sérica son excesivamente altos a partir del nacimiento, debido a que la falla para conjugar la bilirrubina evita que ésta sea excretada por la bilis. La mayor parte de los niños afectados mueren de kernicterus antes de alcanzar la edad de 1 año. Los pacientes con la enfermedad de tipo II presentan una deficiencia parcial de la glucoroniltransferasa. La concentración de la bilirrubina en el suero es baja, y las complicaciones neurológicas son marcadas. La herencia es autosómica recesiva para el desorden del tipo I y autosómica dominante para el del tipo II.

La *ictericia neonatal* se refiere a la hiperbilirrubinemia moderada observada en los recién nacidos de 2 a 5 años de vida. Es causada en parte por inmadurez del sistema de la glucoroniltransferasa. Otros factores incluyen un aumento en la destrucción de los glóbulos rojos y posiblemente una deficiencia de ligandina. A medida que los hepatocitos maduran, la ictericia se reduce espontáneamente, generalmente dentro de los 7 a 10 días a partir del nacimiento. La glucoroniltransferasa es inhibida por ciertas drogas, y su actividad disminuye en las enfermedades hepatocelulares como la hepatitis.

Excreción reducida

La excreción de la bilirrubina dentro de la bilis es el paso limitante en su metabolismo y el más sensible al daño. Por lo tanto, el daño en las células del hígado está asociado con un aumento



en la bilirrubina conjugada. El daño hepatocelular también afecta la asimilación y la conjugación, lo cual contribuye también a un aumento en la bilirrubina no conjugada. La hepatitis y la cirrosis son los trastornos más comunes que producen daño de la célula hepática e ictericia. Algunas drogas pueden ejercer un efecto tóxico directo en las células del hígado. Los anticonceptivos orales y otros esteroides sexuales sintéticos causan una *colestasis* inducida por fármacos en algunas personas.

Los síndromes de *Dubin-Johnson* y *Rotor* son dos desórdenes hereditarios de la excreción de bilirrubina. Ambos están caracterizados por niveles aumentados de bilirrubina conjugada, mientras que otras pruebas rutinarias de funcionales hepáticos permanecen normales. El síndrome de Dubin-Johnson se distingue por un pigmento oscuro que se acumula en los hepatocitos. La herencia de estos desórdenes raros es autosómica recesiva, y el pronóstico excelente.

Obstrucción

La obstrucción mecánica al flujo de las bilis es a menudo producida en su mayor parte por cálculos en el ducto biliar común o por tumores. El cáncer de la cabeza del páncreas comprime la mayor parte de los conductos biliares, mientras que los cánceres del ducto biliar o de la ampulla de Vater ocluyen directamente la porción final del árbol biliar. La constricción postoperatoria del conducto biliar común reduce este pasaje y daña el flujo de la bilis. La bilirrubina sérica aumenta en proporción a la magnitud de la obstrucción y se encuentra, en su mayor parte, conjugada.

Cambio del Compuesto Analizado en la Enfermedad

Un aumento en la bilirrubina sérica acompaña una amplia variedad de estados patológicos. La mayoría de las enfermedades o condiciones que causan la ictericia se originan en el hígado y en el árbol biliar; un porcentaje menor lo constituyen los desórdenes hematológicos. El laboratorio clínico puede medir tanto las fracciones conjugadas como las no conjugadas de la bilirrubina, un primer paso importante en el diagnóstico de la causa de la ictericia. Otras investigaciones de laboratorio de primera línea, incluyen la medida de las actividades de aspartato y alanina aminotransferasa, la actividad de la fosfatasa alcalina (ver págs. 518, 521-523), el tiempo de protombina y un conteo sanguíneo completo con evaluación de frotis periférico. Este grupo de pruebas pueden generalmente identificar la base patofisiológica de la ictericia. Las pruebas más especializadas, como los análisis serológicos para la hepatitis o los estudios radiológicos del árbol biliar, se realizan entonces para hacer un diagnóstico específico.

Bilirrubina (ver pág. 523, métodos)

La bilirrubina sérica se mide más comúnmente por su reacción con el ácido sulfanílico diazotizado para formar dos azodipirroles. La bilirrubina conjugada reacciona en solución acuosa para dar la cantidad de bilirrubina “directa”. La bilirrubina total se mide rápidamente después del agregado de un “acelerador”, tal como el metanol o cafeína, que rompen el puente interno de hidrógeno y permite a la fracción sin conjugar reaccionar también. Se puede



obtener bilirrubina sin conjugar o “indirecta” sustrayendo la bilirrubina directa de la bilirrubina total. Los intervalos de referencia son de 2 a 10 mg/L para la bilirrubina total y de 0 a 2 mg/L para la bilirrubina directa.

Una porción de la bilirrubina conjugada en la sangre es filtrada por los riñones y excretada en la orina. Se puede fácilmente ensayar la bilirrubina urinaria con preparados comerciales (ver pág. 1123 en el capítulo 57), y por lo general no se detecta. La presencia de bilirrubina en la orina indica un aumento en la fracción conjugada de la bilirrubina sérica.

Delta bilirrubina

La delta bilirrubina se mide en ensayos convencionales como parte de la fracción directa de bilirrubina. Debido a que está covalentemente unida a la albúmina, la delta bilirrubina continúa circulando en la sangre por una semana o más después de que la bilirrubina de la orina haya desaparecido. Los estudios clínicos muestran que durante la recuperación a partir de la ictericia hepatocelular, el porcentaje de delta bilirrubina puede aumentar hasta un 80 a 90% de la bilirrubina total. Este nivel es sugestivo del papel que juega la delta bilirrubina en el monitoreo de la fase de recuperación de la enfermedad hepática. Hasta ahora, la medida de la delta bilirrubina no se ha considerado una prueba clínica rutinario.

Urobilinógeno

La excreción normal de urobilinógeno en la orina es de 1 a 4 mg/día. La sobreproducción de bilirrubina, como ocurre en la anemia hemolítica, aumenta la cantidad de urobilinógeno formado en el intestino y por lo tanto la cantidad que es reabsorbida y excretada en la orina. La enfermedad hepatocelular puede también aumentar el urobilinógeno urinario mediante la interferencia con su incorporación y excreción en la bilis. Los procesos que reducen el flujo de la bilirrubina en el intestino, como la obstrucción del ducto biliar, limitan la formación de urobilinógeno y reducen la cantidad excretada en la orina.

El urobilinógeno puede ser detectado con preparados comerciales (ver pág. 1123) y un aumento proporciona evidencia de una causa hemolítica de la ictericia. Sin embargo, el urobilinógeno es de poco uso en el diagnóstico de la enfermedad hepática.

Métodos de Análisis

Gerardo Perrotta

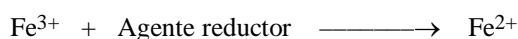
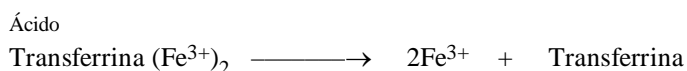
Hierro y capacidad de fijación total de hierro

Principios de análisis y uso corriente.

Muchos métodos se encuentran disponibles para la determinación de las concentraciones de hierro sérico. La mayor parte de los métodos comunes en uso son procedimientos colorimétricos que están basados en la formación de un complejo coloreado después de la interacción del hierro con el agente cromogénico acomplejado con hierro. El hierro debe estar sin ligar y en el estado ferroso (Fe^{2+}) antes de que reaccione con un cromógeno. De esta manera, todos los procedimientos colorimétricos deben primeramente disociar el hierro férrico (Fe^{3+}) que se encuentra ligado a la transferrina por medio del uso de una sustancia acídica liberadora. El hierro férrico liberado es luego reducido al estado ferroso por un agente reductor fuerte. Los agentes reductores que se usan incluyen la hidrazina, el ácido ascórbico, el ácido tioglicólico y la hidroxilamina.^{ref(1400)} Los ligandos cromogénicos



incluyen el sulfonato de batofenantrolina, la ferrozina, el fereno y colorantes del tipo pirridilazo. Los tres pasos empleados por los métodos espectrofotométricos pueden ser resumidos como sigue (Tabla 35-5, método 1).



Se mide la absorbancia del cromógeno en su longitud de onda característica. Los cromógenos que se usan más frecuentemente son el fereno y la ferrozina, los cuales presentan picos de absorción a 600 y 560 nm respectivamente.

También ha sido utilizada la medición del hierro basada en los principios de coulometría (Tabla 35-5, método 2). La determinación coulométrica del hierro está basada en el hallazgo de que se desarrolla un potencial electroquímico en la interfase de una solución salina (es decir, suero) y un electrodo. Un electrodo es mantenido a un potencial constante, seleccionado con respecto a la electropositividad del metal que va a medirse. La electropositividad de un metal es una propiedad química inherente y es una medida de la tendencia de un átomo de metal para perder uno o más electrones.[ref\(1401\)](#) La cantidad de corriente eléctrica que se requiere para mantener el potencial eléctrico del electrodo a un valor constante depende de la electropositividad del metal que va a medirse, así como de la concentración del metal. Debido a que se conoce la electropositividad del hierro y que es una constante, la corriente requerida para mantener un potencial eléctrico constante es proporcional a la concentración de hierro. Un instrumento comercial disponible (ESA, Inc., Bedford, Mass) hace uso del principio arriba mencionado para medir el hierro en el suero. Otros métodos que no son frecuentemente utilizados para medir el hierro incluyen la radiometría y la espectrofotometría de absorción atómica. Aun cuando la absorción atómica (Tabla 35-5, método 3) se utiliza raramente para medir el hierro en el suero, este método es utilizado para medir el contenido de hierro presente en los ejemplares de biopsia del hígado obtenidos para la evaluación de hemocromatosis.

Para interpretar el resultado de la medida de hierro sérico total, es necesario también una aproximación de la capacidad total de fijación de hierro (CTFH). La CTFH es la cantidad de hierro que la transferrina sérica (TR) puede fijar cuando sus sitios de fijación del hierro se encuentran completamente saturados. Se puede estimar la CTFH ya sea por un proceso de substracción o por un proceso de adición. En el método de substracción, el exceso de hierro se agrega al suero para saturar la TR. El exceso de hierro de la muestra se precipita y se mide el total de hierro que permanece. En el método aditivo, una cantidad conocida de hierro se agrega al suero para saturar la TR. Luego es utilizado el procedimiento usual de hierro para medir el hierro sin fijar. La concentración del hierro estándar menos el hierro sin fijar es la capacidad de hierro ligado no fijado (CHNU), el cual puede ser utilizado para calcular la CTFH como sigue:

$$\text{TIBC} = \text{UIBC} + \text{hierro sérico total.}$$

Debido a que el hierro es un elemento ubicuo, debe evitarse la contaminación por reactivos, plásticos, y material de vidrio usados en la medición del hierro. La contaminación puede también ocurrir como resultado de la hemólisis debido al alto contenido en hierro de los eritrocitos. Debe evitarse la presencia de otros iones metálicos que potencialmente interfieran, tales como el cobre. Un agente quelante se emplea a menudo a partir de la reacción con un ligando cromogénico. La tiourea y el ácido tioglicólico son agentes quelantes utilizados frecuentemente. La interferencia a partir del cobre con las determinaciones coulométricas del hierro sérico se acompaña por una selección cuidadosa de los potenciales de cada electrodo, de manera de que las reacciones electroquímicas del cobre sean idénticas en cada electrodo: Debido a que las reacciones de cobre son idénticas en cada electrodo, no existe movimiento neto de los electrones asociados con las reacciones de cobre eliminando así el efecto de este metal en las mediciones del hierro.

Ciertos agentes farmacológicos y condiciones fisiológicas pueden afectar adversamente algunos métodos. Por ejemplo, el hierro-dextrano es utilizado frecuentemente para tratar la deficiencia de hierro en los pacientes que reciben hemodiálisis crónica. Después de la administración parenteral de este compuesto, las concentraciones de hierro en el suero pueden permanecer considerablemente aumentadas durante varias semanas. La mayor parte de los métodos colorimétricos detectan solamente cantidades muy pequeñas de hierro unido al dextrano, porque esta forma de hierro unido es bastante estable en medio ácido, a diferencia del hierro unido a transferrina, que se disocia rápidamente en un medio ácido.[ref\(1402\)](#) Además, los procedimientos coulométricos detectan solamente parte del hierro ligado al dextrano.[ref\(1403\)](#) Se puede realizar una determinación exacta de hierro en pacientes que han recibido la terapia hierro-dextrano por medio del uso de espectroscopía de absorción atómica,[ref\(1404\)](#) la cual mide cuantitativamente el hierro circulante total ligado a la transferrina y al dextrano. Los métodos química seca en portaobjetos excluyen al hierro-dextrano de la placa de reacción y por lo tanto miden solamente el hierro ligado a la transferrina.[ref\(1405\)](#)

La turbidez atribuible a la hipertrigliceridemia en los especímenes usados para el análisis de hierro puede causar un sesgo positivo en los resultados de la prueba si no se utiliza un método blanco.[ref\(1406\)](#) Se ha encontrado también que la presencia de inmunoglobulinas monoclonales en el suero produce aumentos artificiales en los métodos colorimétricos para el hierro.[ref\(1407\)](#)

Muestra.

El suero o plasma heparinizado son especímenes aceptables. Las concentraciones de hierro sérico muestran una variación diurna con valores máximos observados temprano en la mañana. Debido a esta variación diurna, el hierro sérico puede variar hasta un 30% durante el curso del día.

Intervalo de referencia.

Los intervalos de referencia para el hierro son dependientes tanto de la edad como del sexo (Tabla 35-6).[ref\(1408\)](#) Como se mencionó previamente, también se observa una variación diurna en los niveles séricos de hierro, que se atribuye a la variación circadiana en la asimilación y liberación de hierro por los tejidos periféricos.[ref\(1409\)](#) La mañana es el tiempo preferido de toma de muestras para la determinación de las concentraciones de hierro.



Porfobilinógeno

Steven C. Kazmierczak

Principios de análisis y uso actual.

Uno de los métodos más frecuentemente usados para la detección de porfobilinógeno en la orina es el método desarrollado por Watson & Schwartz.[ref\(1410\)](#) Esta prueba cualitativa está basada en la reacción entre el porfobilinógeno y el reactivo del aldehído de Ehrlich (*p*-dimetilaminobenzaldehído en ácido fuerte). Esta reacción da como resultado la formación de un compuesto rojo. Una vez formado dicho compuesto, el color lentamente se torna pálido a medida que el producto de la condensación inicial reacciona con una segunda molécula de porfobilinógeno para formar el dipirilfenil metano incoloro.

La prueba no es totalmente específica para el porfobilinógeno; el urobilinógeno, el indol y el indicano en la orina producirán también un cambio de color. La especificidad del ensayo es aumentada por una extracción con cloroformo de los aductos coloreados que interfieren, operación que se realiza después de adicionar acetato de sodio a la mezcla de reacción para aumentar el pH, permitiendo que estas interferencias se solubilizan preferentemente en cloroformo. De esta manera, si se observa un cambio de color después del agregado del reactivo de Ehrlich y del acetato de sodio, se lleva a cabo una extracción con cloroformo. El color que permanece en la fase acuosa del sobrenadante se supone que es debido a la presencia de porfobilinógeno.

Las modificaciones a la prueba de Watson-Schwartz han sido descritas incluyendo la aplicación directa del reactivo del aldehído de Ehrlich a una placa [ref\(1411\)](#) y a espectrometría con longitud de onda dual.[ref\(1412\)](#)

La prueba de Hoesch es una versión simplificada de la prueba de de Watson-Schwartz, en la cual el aldehído de Ehrlich es utilizado sin acetato de sodio y sin extracción con cloroformo.[ref\(1413\)](#) Aun cuando esta prueba es más fácil de realizar, es menos específica para el porfobilinógeno. Los indoles, ácido-3- indol acético, alfa-metildopa, clorhidrato de fenazopiridina y los pacientes con estado final de malnutrición alcohólica pueden causar falsos positivos en los resultados de la prueba.[ref\(1414\)](#) Un límite a todos estos tests es la reducida sensibilidad.[ref\(1415\)](#) La sensibilidad del ensayo puede ser mejorada por el uso de cromatografía de intercambio iónico.[ref\(1416\)](#)

Muestra.

La porfiria intermitente aguda ocurre por episodios y, como resultado, la orina debe ser colectada durante o inmediatamente después de un ataque. La orina que se colecta en otros momentos puede no mostrar la presencia de porfobilinógeno. Se prefiere una muestra de orina clara fresca, la cual debe ser enfriada a temperatura ambiente antes de ser analizada. El enfriamiento de la muestra ayuda a prevenir que ocurra una reacción de "aldehído caliente". El porfobilinógeno se degrada en la orina bastante rápido. Ambas muestras de orina, la que se determina al azar y la que se toma a diferentes tiempos deben ser protegidas de la luz; las muestras de 24 horas deben ser colectadas en un recipiente que contenga 5g de Na₂CO₃.[ref\(1417\)](#) Por consiguiente, el análisis para el porfobilinógeno debe realizarse varias horas después de la toma o almacenarse en el congelador. [ref\(1418\)](#)



Intervalos de referencia.

Los individuos saludables excretan típicamente menos de 4 mg de porfobilinógeno por día. A estas concentraciones, la prueba exploratoria cualitativa debe ser negativa.

Agradecimientos

Los editores desean agradecer la versión previa de la sección de Porfobilinógeno escrita por Michael D.D. McNeely.

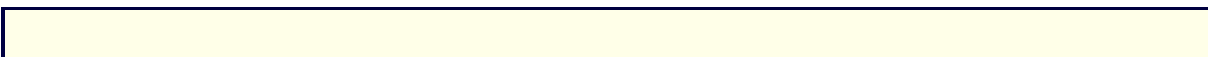
Referencias

1. Perrota G: Iron and iron binding capacity. In Kaplan LA, Pesce AJ, editors: *Methods in clinical chemistry*, St. Louis, 1987, Mosby.
2. Zak B, Baginski ES, Epstein E: Modern iron ligands useful for the measurement of serum iron, *Ann Clin Lab Sci* 10:276-289, 1980.
3. Zak B, Baginski ES, Epstein E: Modern iron ligands useful for the measurement of serum iron, *Ann Clin Lab Sci* 10:276-289, 1980.
4. Huisman W: Interference of Imferon in colorimetric assays for iron, *Clin Chem* 26:635-637, 1980.
5. Jacobs JC, Alexander NM: Colorimetry and constant-potential coulometry determinations of transferrin-bound iron, total iron binding capacity, and total iron in serum containing iron-dextran, with use of sodium dithionite and alumina columns, *Clin Chem* 36:1803-1807, 1990.
6. McIntosh ME, Lynn JK, Meyerriecks N, et al: Serum iron determination in patients receiving therapy with iron dextran ("Imferon"), *Clin Chem* 22:524-527, 1976.
7. Labbe D, Phung HT, Vassault A, et al: Direct methods vs blanking methods for iron determination: effect of serum turbidity, *Clin Chem* 38:782-783, 1992.
8. Dorizzi R, Battaglia P, Lora A: Iron measurement in patients with monoclonal immunoglobulin: a further caution, *Clin Chem* 37:589-590, 1991.
9. Bakker AJ: Influence of monoclonal immunoglobulins in direct determinations of iron in serum, *Clin Chem* 37:690-694, 1991.
10. Vercammen M, Goedhuys W, Boeyckens A, et al: Iron and total iron-binding capacity in serum of patients receiving iron-dextran: Kodak Ektachem methodologies, spectrophotometry, and atomic-absorption spectrometry compared, *Clin Chem* 36:1812-1815, 1990.
11. Bothwell TH, Charlton RW, Motulsky AG: Hemochromatosis. In Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Walli D, editors: *The metabolic basis of inherited disease*, ed 6, New York, 1989, McGraw-Hill.
12. Watson CJ, Schwartz S: Simple test for urinary porphobilinogen, *Proc Soc Exp Biol Med* 47:393-394, 1941.
13. With TK: Screening for acute porphyria, *Lancet* 2:1187-1188, 1970.
14. Moore DJ, Labbe RF: A quantitative assay for urinary porphobilinogen, *Clin Chem* 10:1105-1111, 1964.
15. Hoesch K: ber die Pantothen-säurebehandlung der Porphyrie, *Dtsch Med Wochenschr* 72:252-254, 1947.
16. Pierach CA, Cardinal R, Bossenmaier I, Watson CJ: Comparison of the Hoesch and the Watson-Schwartz tests for urinary porphobilinogen, *Clin Chem* 23:1666-1668, 1977.
17. Schreiber WE, Jamani A, Pudek MR: Screening tests for porphobilinogen are insensitive: the problem and its solution, *Am J Clin Pathol* 92:644-649, 1989.
18. Schreiber WE: *ASCP Check Sample cc-252*, Chicago, 1994, American Society of Clinical Pathologists.
19. Watson CJ, Bossenmaier I, Cardinal R: Acute intermittent porphyria, *JAMA* 175:1087-1091, 1961.

Bibliografía

Metabolismo de hierro

Bothwell TH, Charlton RW, Motulsky AG: Hemochromatosis. In Scriver CR et al, editors: *The metabolic basis* 1470



- of inherited disease*, ed 6, New York, 1989, McGraw-Hill.
- Bridges KR, Bunn HF: Anemias with disturbed iron metabolism. In Wilson JD et al, editors: *Harrison's principles of internal medicine*, ed 12, New York, 1991, McGraw-Hill.
- Cavill I, Jacobs A, Worwood M: Diagnostic methods for iron status, *Ann Clin Biochem* 23:168-171, 1986.
- Crosby WH: Hemochromatosis: current concepts and management, *Hosp Pract* 22:173-192, 1987.
- Fairbanks VF, Beutler E: Iron metabolism. In Williams WJ et al, editors: *Hematology*, ed 4, New York, 1990, McGraw-Hill.
- Fairbanks VF, Beutler E: Iron deficiency. In Williams WJ et al, editors: *Hematology*, ed 4, New York, 1990, McGraw-Hill.
- Jacobs A, Worwood M, editors: *Iron in biochemistry and medicine*, II, London, 1980, Academic Press.
- Kushner JP: Hypochromic anemias. In Wyngaarden JB et al, editors: *Cecil textbook of medicine*, ed 19, Philadelphia, 1992, Saunders.
- Powell LW, Isselbacher KJ: Hemochromatosis. In Wilson JD et al, editors: *Harrison's principles of internal medicine*, ed 12, New York, 1991, McGraw-Hill.

Síntesis del grupo hemo y las porfirias

- Anderson KE: The porphyrias. In Wyngaarden JB et al, editors: *Cecil textbook of medicine*, ed 19, Philadelphia, 1992, Saunders.
- Deacon AC: Performance of screening tests for porphyria, *Ann Clin Biochem* 25:392-397, 1988.
- Kappas A, Sassa S, Galbraith RA, Nordmann Y: The porphyrias. In Scriver CR et al, editors: *The metabolic basis of inherited disease*, ed 6, New York, 1989, McGraw-Hill.
- Kauppinen R, Mustajoki P: Prognosis of acute porphyria: occurrence of acute attacks, precipitating factors, and associated diseases, *Medicine* 71:1-13, 1992.
- Meyer UA: Porphyrias. In Wilson JD et al, editors: *Harrison's principles of internal medicine*, ed 12, New York, 1991, McGraw-Hill.
- Moore MR, McColl KEL, Rimington C, Goldberg A: *Disorders of porphyrin metabolism*, New York, 1987, Plenum Publishing.
- Nordmann Y, de Verneuil H, Deybach J-C, et al: Molecular genetics of porphyrias, *Ann Med* 22:387-391, 1990.
- Pudek MR, Schreiber WE, Jamani A: Quantitative fluorometric screening test for fecal porphyrins, *Clin Chem* 37:826-831, 1991.
- Schreiber WE, Jamani A, Pudek MR: Screening tests for porphobilinogen are insensitive: the problem and its solution, *Am J Clin Pathol* 92:644-649, 1989.
- Westerlund J, Pudek M, Schreiber WE: A rapid and accurate spectrofluorometric method for quantification and screening of urinary porphyrins, *Clin Chem* 34:345-351, 1988.

Bilirrubina

- Chowdhury JR, Wolkoff AW, Arias IM: Hereditary jaundice and disorders of bilirubin metabolism. In Scriver CR et al, editors: *The metabolic basis of inherited disease*, ed 6, New York, 1989, McGraw-Hill.
- Isselbacher KJ: Bilirubin metabolism and hyperbilirubinemia. In Wilson JD et al, editors: *Harrison's principles of internal medicine*, ed 12, New York, 1991, McGraw-Hill.
- Isselbacher KJ: Jaundice and hepatomegaly. In Wilson JD et al, editors: *Harrison's principles of internal medicine*, ed 12, New York, 1991, McGraw-Hill.
- Ostrow JD, editor: *Bile pigments and jaundice: molecular, metabolic, and medical aspects*, New York, 1986, Marcel Dekker.
- Sherlock S, Dooley J: *Diseases of the liver and biliary system*, ed 9, Oxford, 1993, Blackwell Scientific.
- Weiss JS, Gautam A, Lauff JJ, et al: The clinical importance of a protein-bound fraction of serum bilirubin in patients with hyperbilirubinemia, *N Engl J Med* 309:147-150, 1983.



Wu T-W: Delta bilirubin-the state of the art and future prospects. In Goldberg DM, Walker WHC, editors: *Clinical biochemistry reviews*, vol 1, New York, 1987, Pergamon Press.

Zimmerman HJ, Deschner KW: Differential diagnosis of jaundice, *Hosp Pract* 22:99-122, 1987.

Tablas

Tabla 35-1. Distribución y función del hierro en un hombre adulto normal.

Compuesto	Función	Hierro (mg)
Hemoglobina	Transporte de O ₂ , sangre	2500
Mioglobina	Almacenamiento de O ₂ , músculo	300
Enzimas		
Catalasa	Descomposición de H ₂ O ₂	300
Peroxidasas	Oxidación	300
Citocromos	Transporte de electrones	300
Hierro-azufre*	Transporte de electrones	300
Transferrina*	Transporte de Hierro	4
Ferritina* y hemosiderina*	Almacenamiento de Hierro	1000
*Compuestos de hierro no-hemo		

Tabla 35-2. Mediciones de laboratorio del estado de hierro.

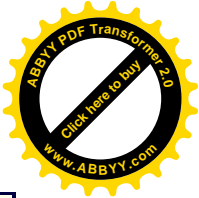
Enfermedad:	Saludable
Hierro sérico (µg/L):	650-1750 (hombres) 500-1700 (mujeres)
TIBC (µg/L):	2500-4500
Saturación de Transferrina (%):	20-50 (hombres) 15-50 (mujeres)
Ferritina sérica (µg/L):	20-250 (hombres) 10-120 (mujeres)
Protoporfirina eritrocitaria libre (µg/L):	170-770
Depósitos tisulares de hierro:	N
Enfermedad:	Deprivación del depósito de hierro, no-anemia
Hierro sérico (µg/L):	N



TIBC (µg/L):	N
Saturación de Transferrina (%):	N
Ferritina sérica (µg/L):	↓
Protoporfirina eritrocitaria libre (µg/L):	N
Depósitos tisulares de hierro:	↓
Enfermedad:	Anemia por deficiencia de hierro
Hierro sérico (µg/L):	↓
TIBC (µg/L):	↑
Saturación de Transferrina (%):	↓
Ferritina sérica (µg/L):	↓
Protoporfirina eritrocitaria libre (µg/L):	↑
Depósitos tisulares de hierro:	↓
Enfermedad:	Anemia de enfermedad crónica
Hierro sérico (µg/L):	↓
TIBC (µg/L):	↓
Saturación de Transferrina (%):	↓
Ferritina sérica (µg/L):	N o ↑
Protoporfirina eritrocitaria libre (µg/L):	↑
Depósitos tisulares de hierro:	N o ↑
Enfermedad:	Rasgo de talasemia
Hierro sérico (µg/L):	N
TIBC (µg/L):	N
Saturación de Transferrina (%):	N
Ferritina sérica (µg/L):	N
Protoporfirina eritrocitaria libre (µg/L):	N
Depósitos tisulares de hierro:	N
Enfermedad:	Anemia sideroblástica
Hierro sérico (µg/L):	↑
TIBC (µg/L):	N
Saturación de Transferrina (%):	↑
Ferritina sérica (µg/L):	↑
Protoporfirina eritrocitaria libre (µg/L):	N o ↑
Depósitos tisulares de hierro:	↑
Enfermedad:	Hemocromatosis
Hierro sérico (µg/L):	↑
TIBC (µg/L):	↓
Saturación de Transferrina (%):	↑
Ferritina sérica (µg/L):	↑
Protoporfirina eritrocitaria libre (µg/L):	N
Depósitos tisulares de hierro:	↑
N, Normal (dentro del intervalo de referencia); ↓, disminuído; ↑, aumentado.	

Tabla 35-3. Características bioquímicas y clínicas de las porfirias.

Rasgo:	Defecto enzimático
Porfiria intermitente aguda:	Porfobilinógeno desaminasa
Porfiria variegata:	Protoporfirinógeno oxidasa
Coproporfiria:	Coproporfironógeno oxidasa
Porfiria cutánea tarda:	Uroporfironógeno decarboxilasa
Porfiria cutánea tarda:	Ferroquelatasa
Porfiria eritropoyética congénita:	Uroporfironógeno III cosintasa
Rasgo:	Herencia
Porfiria intermitente aguda:	Autosómica dominante
Porfiria variegata:	Autosómica dominante
Coproporfiria:	Autosómica dominante
Porfiria cutánea tarda:	Autosómica dominante
Porfiria cutánea tarda:	Autosómica dominante
Porfiria eritropoyética congénita:	Autosómica recesiva
Rasgo:	Dolor abdominal y síntomas neurológicos
Porfiria intermitente aguda:	Si
Porfiria variegata:	Si
Coproporfiria:	Si
Porfiria cutánea tarda:	No
Porfiria cutánea tarda:	No
Porfiria eritropoyética congénita:	No
Rasgo:	Fotosensibilidad y lesiones cutáneas
Porfiria intermitente aguda:	No
Porfiria variegata:	Si
Coproporfiria:	Si
Porfiria cutánea tarda:	Si
Porfiria cutánea tarda:	Si
Porfiria eritropoyética congénita:	Si
Rasgo:	Expresión metabólica
Porfiria intermitente aguda:	Hígado
Porfiria variegata:	Hígado
Coproporfiria:	Hígado
Porfiria cutánea tarda:	Hígado
Porfiria cutánea tarda:	Células eritroideas e hígado
Porfiria eritropoyética	

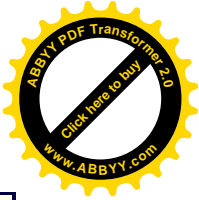
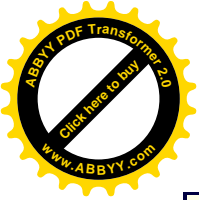


congénita:	Células eritroideas
-------------------	---------------------

Tabla 35-4. Diagnóstico de laboratorio de las porfirias.

Porfíria:	Neurológica
Porfíria:	Porfíria intermitente aguda
ALA y PBG urinarias:	↑
Porfirinas urinarias:	URO ↑ *
Porfirinas fecales:	N
Porfirinas de los glóbulos rojos:	N
Porfíria:	Porfíria variegata
ALA y PBG urinarias:	↑
Porfirinas urinarias:	COPRO ↑
Porfirinas fecales:	PROTO ↑
Porfirinas de los glóbulos rojos:	N
Porfíria:	Coproporfíria
ALA y PBG urinarias:	↑
Porfirinas urinarias:	COPRO ↑
Porfirinas fecales:	COPRO ↑
Porfirinas de los glóbulos rojos:	N
Porfíria:	Cutánea
Porfíria:	Porfíria cutánea tarda
ALA y PBG urinarias:	N
Porfirinas urinarias:	URO ↑ 7-carboxil ↑
Porfirinas fecales:	Isocoproporfirina ↑
Porfirinas de los glóbulos rojos:	N
Porfíria:	Protoporfíria
ALA y PBG urinarias:	N
Porfirinas urinarias:	N
Porfirinas fecales:	PROTO ↑
Porfirinas de los glóbulos rojos:	PROTO ↑
Porfíria:	Porfíria eritropoyética congénita
ALA y PBG urinarias:	N
Porfirinas urinarias:	URO ↑ COPRO ↑
Porfirinas fecales:	COPRO ↑
Porfirinas de los glóbulos rojos:	URO ↑ COPRO ↑

N, Normal (dentro del intervalo de referencia); ↑, aumentado



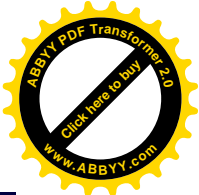
* Puede estar aumentado solamente durante ataque agudo.

Tabla 35-5. Métodos de análisis de hierro.

Tipo de análisis: 1. Coulorimétrico	
Principio:	$\text{Transferrina (Fe}^{3+}\text{)}_2 \xrightarrow[\text{Agente reductor}]{\text{Buffer}} 2\text{Fe}^{2+} + \text{Transferrina}$ <p>F²⁺ + Complejo cromógeno coloreado</p>
Uso:	Suero
Comentarios:	Buen coeficiente de variación; no es necesario remover previamente la proteína; ensayo manual Bueno para determinación urgente; automático.
Tipo de análisis: 2. Coulométrico	
Principio:	Voltaje constante en cada uno de los dos electrodos. La reacción en cada electrodo es: E1: $\text{Fe}^{2+} - e \longrightarrow \text{Fe}^{3+}$ E2: $\text{Fe}^{3+} + e \longrightarrow \text{Fe}^{2+}$ Pérdida de electrón en E1 y ganancia de electrón en E2 constituye flujo corriente, el cual es proporcional a la concentración de hierro.
Uso:	Suero
Comentarios:	Correlaciona bien con el método cromogénico. Presenta muy buena exactitud y precisión. Excelente para micromuestras y urgencia; puede ser automático.
Tipo de análisis: 3. Absorción atómica	
Principio:	El hierro se concentra por quelación con la batofenantrolina y se extrae en metilisobutil cetona (MIBK). El extracto es analizado por absorción atómica a 248.3 nm.
Uso:	Suero
Comentarios:	No es práctico para uso rutinario

Tabla 35-6. Intervalos de referencia para hierro sérico.

Edad	Hierro, $\mu\text{mol/L}$ ($\mu\text{g/L}$)
Recién nacidos	17.9-44.8 (1000-2500)
Infante	7.2- 17.9 (400-1000)
Niño	9.0-17.9 (500-1200)
Hombre adulto	11.6- 31.3 (650-1750)
Mujer adulta	9.0- 30.4 (500-1700)



Figuras

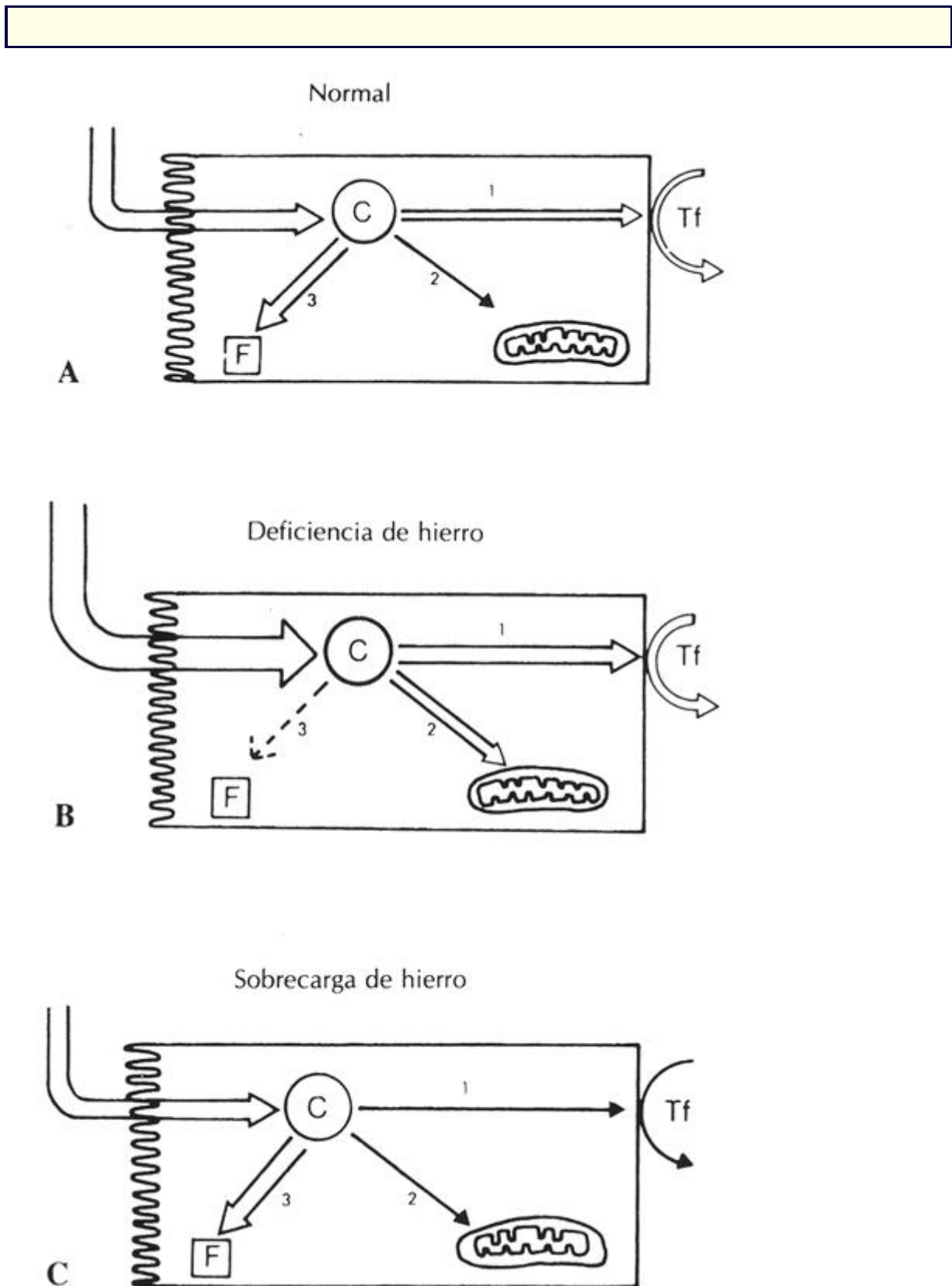
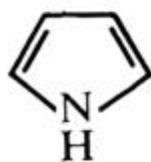
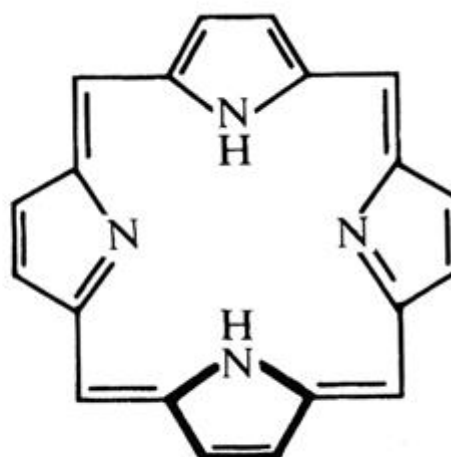


Figura 35-1 Asimilación de hierro y disposición dentro de la célula epitelial del intestino delgado. A, Estado normal del hierro. B, Deficiencia de hierro: asimilación aumentada y transferencia de hierro al plasma (1) y a la mitocondria (2), con

transferencia reducida de ferritina (3). C, Hierro depositado: asimilación normal con transferencia reducida al plasma (1) y transferencia aumentada a la ferritina (3). C, acarreador intracelular de hierro; F, ferritina; Tf, transferrina. (De Jacobs A: *Clin. Haematol* 2: 323, 1973).



PIRROL



ANILLO DE PORFIRINA

Figura 35-2 Estructuras del pirrol y del anillo de porfirina. La estructura en negrilla es el anillo pirrólico básico.

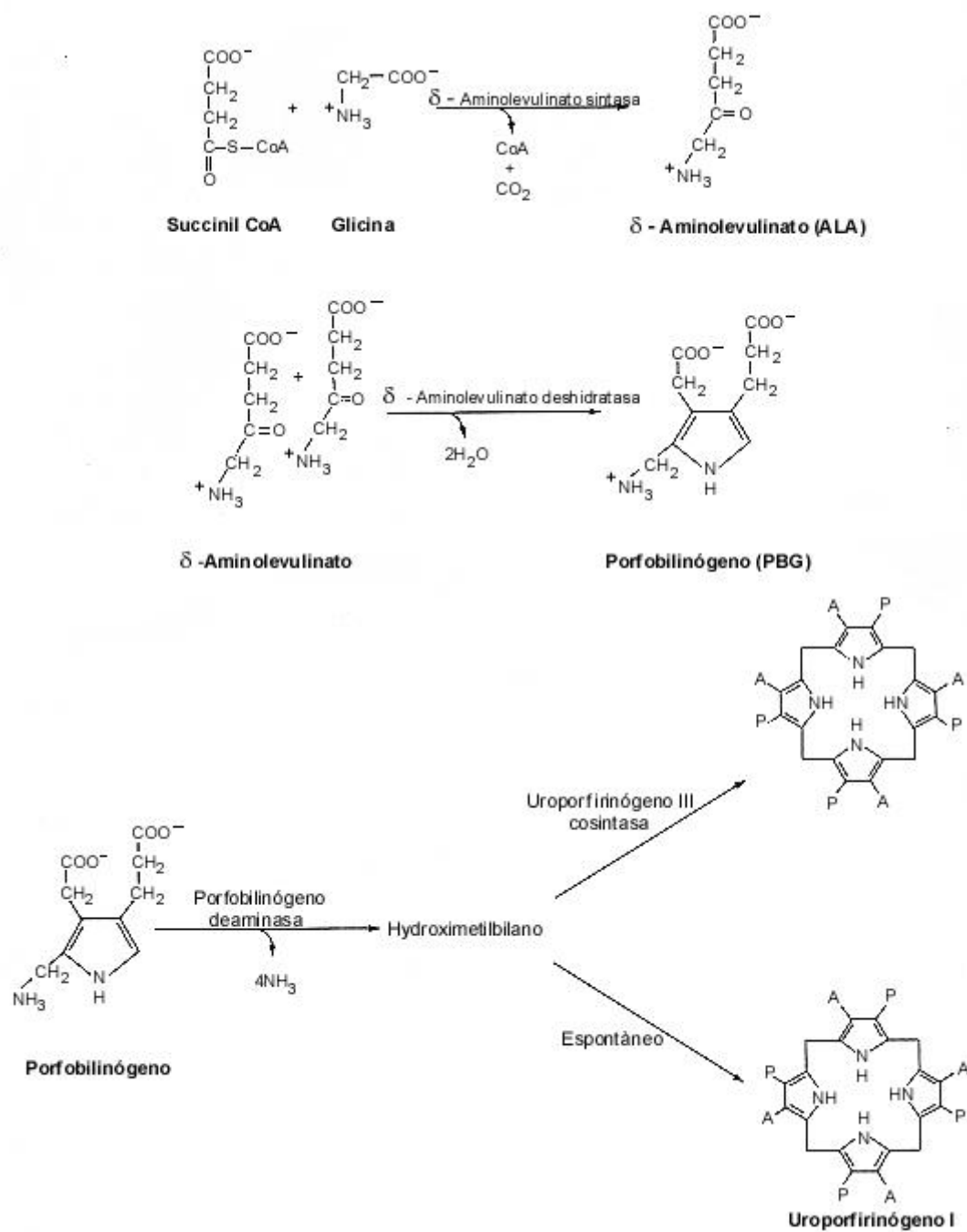
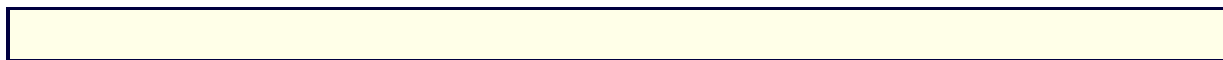


Figura 35-3 Pasos iniciales en la síntesis de porfirina. A, Acetato; P, propionato

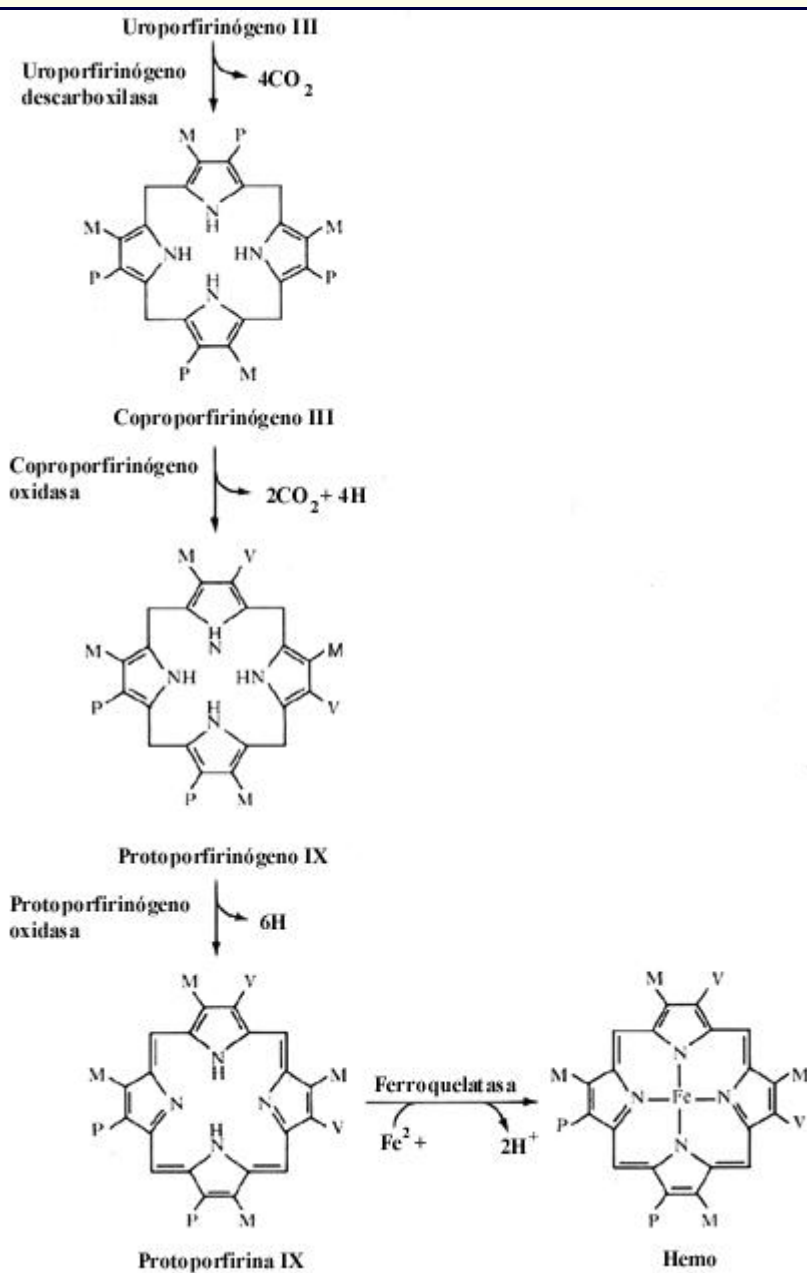


Figura 35-4 Última mitad de la vía biosintética del Hemo. *M*, Metilo; *P*, propionato; *V*, Vinilo

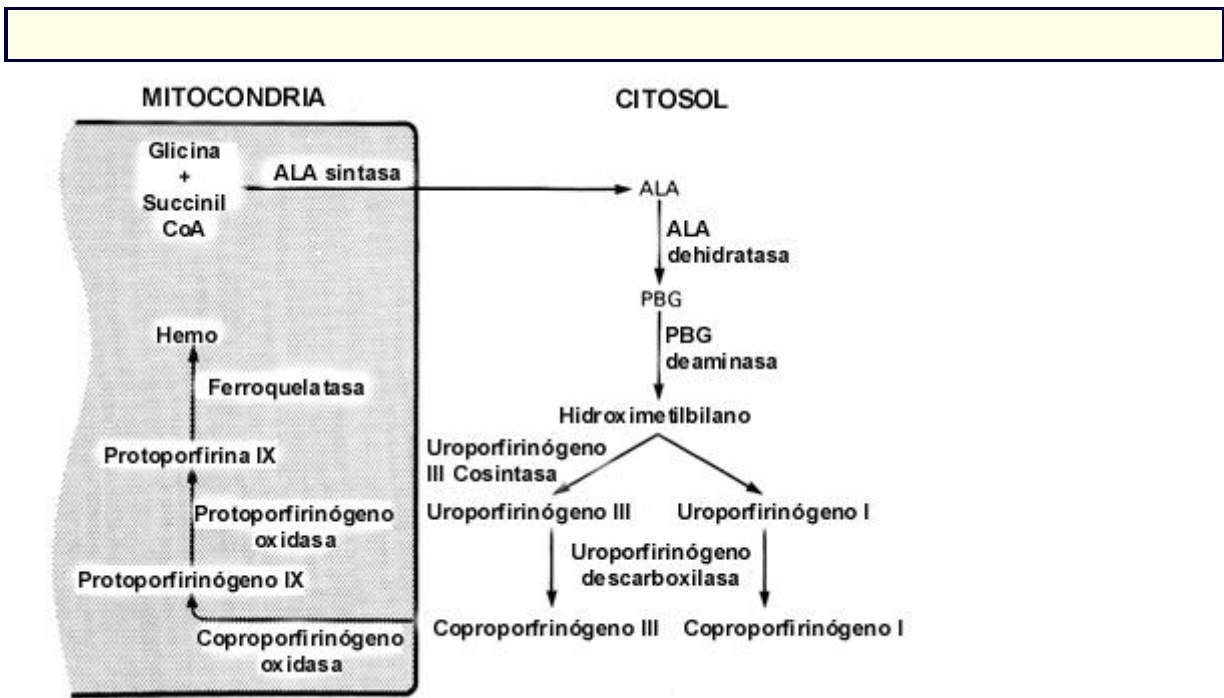


Figura 35-5 Distribución de la vía de porfirina entre la mitocondria y el citosol.

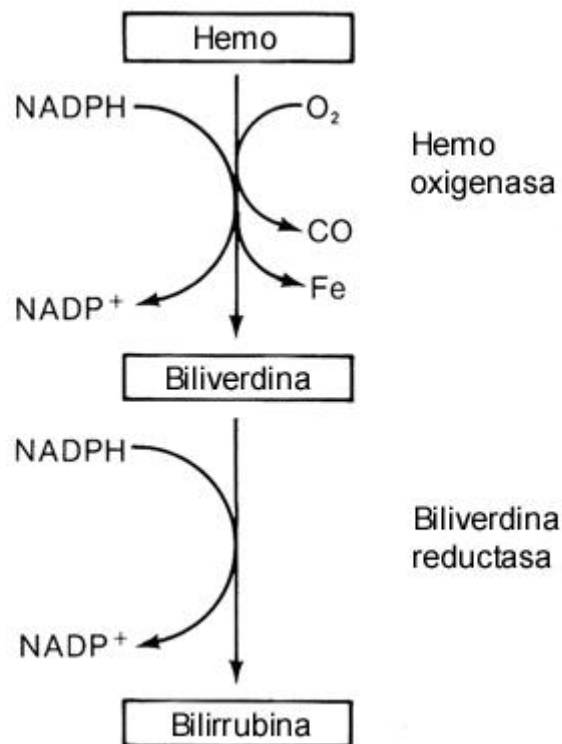


Figura 35-6 Formación de la bilirrubina a partir del hemo.

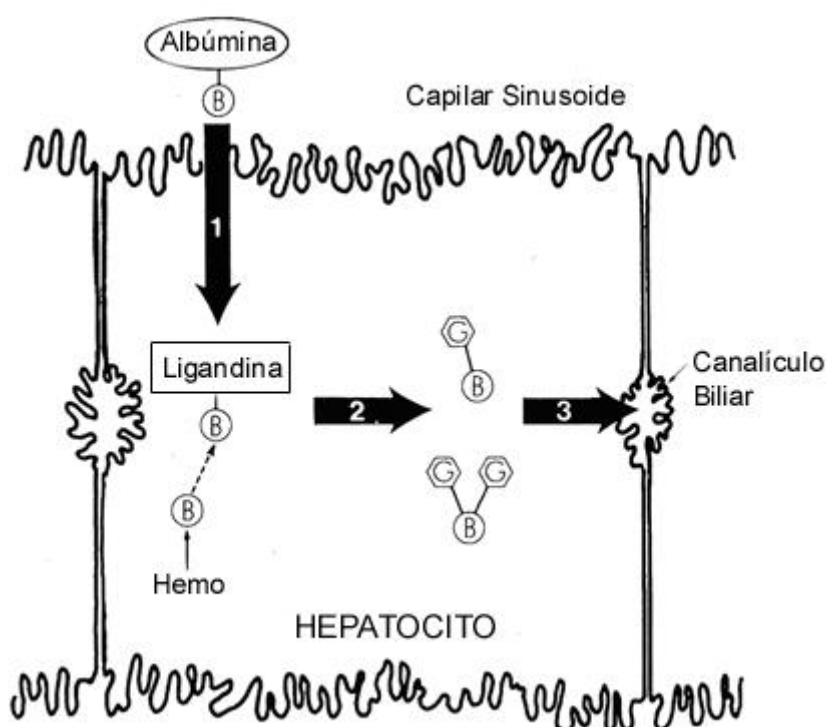


Figura 35-7 Metabolismo hepático de la bilirrubina. Los pasos indicados son (1) asimilación, (2) conjugación, y (3) excreción. Una pequeña cantidad de bilirrubina es producida por ruptura de las proteínas que contienen hemo dentro de los hepatocitos. B, Bilirrubina; C, ácido glucorónico.

CAPÍTULO 36

36. Hemoglobina

Harold R. Schumacher

Patricia A. Miller-Canfield

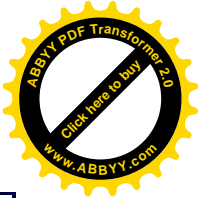
Estructura y función de la hemoglobina

Estructura

Ontogenia

Bioquímica de la hemoglobina normal

1483



Ensamble de la hemoglobina

- Interrelaciones funcionales y estructurales**
- Afinidad y transporte del oxígeno**
- 2,3-difosfoglicerato**
- Otros derivados químicos de la hemoglobina**

Hemoglobinas humanas normales

Hemoglobina A (α₂β₂)

- Hemoglobina A₂ (α₂δ₂)**
- Hemoglobina fetal (α₂γ₂)**

Condiciones patológicas

Hemoglobinopatías

- Variantes estructurales de la hemoglobina**
- Clasificación**
- Desórdenes de células falciformes: hemoglobina falciforme**
- Mecanismo molecular de formación de células falciformes**
- Patofisiología de la enfermedad de células falciformes**
- Rasgos de la célula falciforme (HbAS)**
- Anemia falciforme (HbSS)**
- Enfermedad de la célula HbC falciforme**
- Rasgos y enfermedad de HbC**
- Enfermedad de la hemoglobina C (HbCC)**
- Rasgos y enfermedad de la hemoglobina E**
- Desorden de la hemoglobina inestable**

Talasemias

Definiciones

- Clasificaciones**
- Alfa talasemias**
- Beta talasemias**
- Persistencia hereditaria de la hemoglobina fetal (PHHF)**
- Metahemoglobinemia**

Cambio del compuesto analizado en la enfermedad

Interpretación de los valores de la hemoglobina

- HbF**
- HbA_{1c}**
- Carboxihemoglobina (CO-Hb)**
- Saturación de oxígeno**
- 2,3-difosfoglicerato**
- Otras hemoglobinas**
- Otros descubrimientos bioquímicos relacionados**
- Uso de los resultados del hemograma para diferenciar**
- Deficiencia de hierro en las talasemias**

Métodos de análisis



Haptoglobina

Hemoglobina F

Separación y cuantificación de la hemoglobina

Se cree que todos los genes de la globina provienen de una proteína hemo de tipo globina común. La duplicación más temprana de este gen progenitor condujo a la divergencia de la mioglobina y de las globinas que componen la hemoglobina. A partir de este gen ancestral de globina divergieron los genes de la α -globina, los cuales incluyen el gen zeta. El gen de la β -globina ancestral evolucionó para formar las familias de genes de la hemoglobina. En un orden estimado de aparición, se encuentran los genes de la γ -globina, la ε -globina, y la δ -globina. Las proteínas modernas de globina son el resultado de un proceso evolutivo que comenzó hace más de 700 millones de años (Fig. 36-1). Las mutaciones siguen ocurriendo, con frecuencia resultando en estados de enfermedad llamadas *hemoglobinopatías*.

Estructura y Función de la Hemoglobina

Estructura

La hemoglobina (Hb) es una proteína pigmentada de rojo, transportadora de oxígeno y se encuentra en los glóbulos rojos sanguíneos. Es un tetrámero globular (peso molecular 68,000 daltones) que consiste en dos pares de cadenas polipeptídicas diferentes (Fig. 36-2). Cada cadena lleva un derivado de porfirina que contiene hierro, llamado *hemo*, una ferroprotoporfirina IX, en la cual un átomo de hierro está unido en el centro del anillo porfirínico. Las cadenas polipeptídicas (sin hemo) son denominadas colectivamente como la parte *globina* de la hemoglobina. Cada cadena polipeptídica se designa por una letra griega: α (alfa), β (beta), γ (gamma), δ (delta), ε (épsilon), y ζ (zeta). La hemoglobina normal de mamíferos contiene dos pares de cadenas; dos cadenas α y dos cadenas no α (β , γ , o δ). Las cadenas α se unen con cadenas β para formar la Hb normal adulta ($\text{HbA} = \alpha_2\beta_2$). Estas cadenas α se unen con cadenas γ para formar la Hb fetal ($\text{HbF} = \alpha_2\gamma_2$), y también se unen con cadenas δ para formar HbA_2 ($\text{HbA}_2 = \alpha_2\delta_2$). La última corresponde solamente al 2.5% de la Hb adulta normal. Las dos Hbs embrionarias tempranas denominadas Gower 1 y Gower 2, consisten de cadenas ζ de tipo alfa y cadenas ε de tipo beta.

Se han determinado las estructuras primaria, secundaria, terciaria, y cuaternaria de todas las hemoglobinas. Las cadenas β , γ , δ , y ε tienen secuencias de aminoácidos similares, así como también las tienen las cadenas α y ζ . Las cadenas α contienen 141 residuos de aminoácidos, y cada una de las cadenas β , δ , y ε contiene 146.

En todas las cadenas de hemoglobina y de mioglobina, aproximadamente el 75% de los aminoácidos están ordenados en una α hélice con 3 a 6 aminoácidos por vuelta (Fig. 36-3). La estructura terciaria de la hemoglobina está representada en la Fig. 36-4. El patrón de plegamiento ubica a los residuos de aminoácidos polares en el lado externo de la molécula y provee un hueco con un nicho hidrofóbico profundo para el anillo hemo entre las hélices E y F en cada subunidad proteínica. Varias uniones no covalentes se forman entre la parte hemo y

los aminoácidos vecinos. Un átomo de hierro, en el estado ferroso (Fe^{2+}), forma dentro del centro del anillo de protoporfirina IX un enlace importante con la histidina F8, o proximal, así como con la histidina E7, o distal a través del oxígeno unido. Este hierro hémico es crítico ya que la oxigenación o desoxigenación ocurre en este sitio.

El tetrámero de hemoglobina completo está compuesto de dos globinas α y dos globinas no α que interactúan para formar una estructura cuaternaria (Fig. 36-5). La cavidad central está ocupada con agua y permite la entrada de pequeñas moléculas como 2,3-difosfoglicerato (2,3-DFG) y sales. El movimiento de las cadenas individuales de globina, incluyendo el movimiento de las cadenas de globina relacionadas unas a otras durante la oxigenación y la desoxigenación, le confiere a la hemoglobina su capacidad única de servir como un transportador de oxígeno. La sustitución de un solo aminoácido puede cambiar las estructuras secundaria, terciaria, y cuaternaria de la hemoglobina, ocasionando cambios fisiopatológicos severos y aun fatales.

Ontogenia

La composición de la hemoglobina de un eritrocito varía enormemente dependiendo de cuándo se produce dicho eritrocito, si lo es durante la gestación o en el desarrollo posnatal. Las primeras cadenas de globina formadas eritrocitos embrionarios son las cadenas ϵ , que se parecen a las cadenas β en su estructura primaria.^{ref(1419)} Casi inmediatamente, comienza la síntesis de las cadenas ζ , α , y γ . La activación e inactivación secuencial o *cambio*, entre genes dentro de los agrupamientos génicos de α globina y no α globina, resultan en la formación de cuatro hemoglobinas embrionarias encontradas comúnmente. Estas son Gower 1, $\zeta_2\epsilon_2$, Gower 2, $\alpha_2\epsilon_2$, Portland, $\zeta_2\gamma_2$, y hemoglobina fetal, $\alpha_2\gamma_2$. Las hemoglobinas Gower 1 y Gower 2 constituyen el 42% y 24% de la hemoglobina total, respectivamente, a las cinco semanas de gestación. El resto es hemoglobina fetal. El cambio de hemoglobinas durante el desarrollo embrionario fetal y adulto se muestra en la Fig. 36-6.

Bioquímica de la Hemoglobina Normal

Ensamblaje de la hemoglobina

Los genes de globina tipo α humanos están localizados en el brazo corto del cromosoma 16, entre la banda P 13.2 y el segmento final, mientras que los genes tipo β están localizados en la porción terminal del brazo corto del cromosoma 11 (P15).^{ref(1420)} Las cadenas polipeptídicas α y β de una hemoglobina adulta son sintetizadas en cantidades iguales, aunque podría haber un exceso de cadenas α en el citoplasma de los glóbulos rojos jóvenes. El proceso de ensamblaje comienza con la liberación de las cadenas α y β de los ribosomas hacia el citoplasma. Dichas cadenas inmediatamente incorporan el hemo (ver capítulo 35, para discusión de la síntesis del hemo) y forman combinaciones de monómeros y agregados de dímeros, seguidos por la síntesis de tetrámeros. En las hemoglobinopatías, las concentraciones de los dos tipos de cadenas, como βA y βS ; βA y βC ; y βA y βE , pueden diferir aun cuando sus velocidades de síntesis sean las mismas. Hay evidencia de que las velocidades relativas de ensamblaje en relación a la síntesis de hemoglobinas A y S pueden diferir debido a diferencias en afinidades de βA y βS para las cadenas α . Sí se encuentran en



poca cantidad. Las cadenas α , se combinan preferentemente con cadenas β normales sobre las cadenas variantes, [ref\(1421\)](#) y el exceso de las cadenas variantes son luego removidas por proteólisis.

La síntesis de hemoglobina se encuentra normalmente estimulada por tejidos hipóxicos (baja PO_2 en tejidos). La hipoxia causa que los riñones produzcan cantidades aumentadas de eritropoyetina (ver pág.490), la cual estimula la producción de hemoglobina y eritrocitos.

Interrelaciones funcionales y estructurales

Hemoglobina y oxígeno: la curva de disociación de oxígeno.

Cada una de las cuatro subunidades de la hemoglobina contiene una porción hémica profunda en la cavidad de las cadenas de globina, dejando un borde terminal del hemo expuesto para recibir al oxígeno. Cada uno de los cuatro átomos de hierro hémico puede unirse reversiblemente a una molécula oxígeno. Debido a que el hierro permanece en la forma ferrosa, la reacción es una oxigenación, no una oxidación.

Para cumplir su función como un pigmento respiratorio, la hemoglobina debe unirse específicamente a moléculas de oxígeno con elevada afinidad, transportándolas, y dejándolas en aquellos tejidos con baja tensión de oxígeno. Aproximadamente 1.34 mL de oxígeno están unidos por cada gramo de hemoglobina. La estructura tetramérica de la hemoglobina es responsable de su capacidad de unión característica al oxígeno y la hace fisiológicamente superior a subunidades simples de hemoglobina o mioglobina. El hierro hémico tiene seis uniones de valencia, cuatro de las cuales están ocupadas por los cuatro anillos pirrólicos del hemo. La quinta unión de valencia del hierro une el hemo a la globina, dejando a la sexta unión de valencia del hierro disponible para una combinación reversible con el oxígeno u otros ligandos.

La afinidad de la hemoglobina por el oxígeno depende de la presión parcial de oxígeno (PO_2). Una gráfica del contenido de oxígeno (porcentaje de hemoglobina saturada con oxígeno) contra la PO_2 en las subunidades de mioglobina produce una curva hiperbólica de disociación de oxígeno, pero una gráfica similar usando hemoglobina da una curva sigmoide (Fig. 36-7). La curva hiperbólica indica liberación considerable del oxígeno a muy bajas presiones parciales, mientras que la curva sigmoide indica una liberación mucho más temprana de oxígeno aun a tensiones de oxígeno relativamente altas, permitiendo una adecuada oxigenación en los tejidos. La curva tiene una forma sigmoide porque la oxigenación de un grupo hemo aumenta la afinidad del oxígeno de los otros grupos, un fenómeno llamado *interacción hemo-hemo* (o *cooperatividad de subunidades*), la cual es responsable de la captura y liberación fisiológicamente eficiente del oxígeno. Hay un cambio progresivo en la afinidad del oxígeno a medida que cada molécula de hemo es oxigenada; la afinidad por el oxígeno es baja al principio pero aumenta a medida que cada molécula de hemo incorpora el oxígeno. En la mioglobina, la curva de disociación hiperbólica indica que cada molécula es oxigenada independientemente. En el pulmón, a una PO_2 aproximada de 95 mm Hg, la sangre arterial se satura un 97% con oxígeno y transporta 20 volúmenes de oxígeno por 1000 mL de sangre. En el lecho capilar, la sangre venosa a una tensión de PO_2 de 40 mm de Hg sigue saturada un 75% con oxígeno pero sin embargo es capaz de acarrear 46 volúmenes de oxígeno por 1000 mL de sangre. El 75% de la hemoglobina retorna a los pulmones en una

forma oxigenada estableciendo un gran reservorio para aumentar la distribución del oxígeno en los tejidos.

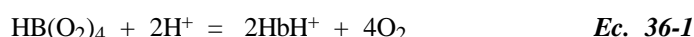
La posición de la curva de disociación del oxígeno está determinada por varios factores que afectan la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno. La curva de disociación del oxígeno está indicada convencionalmente por el valor de P_{50} , o sea la PO_2 a la cual la hemoglobina se satura al 50% con O_2 ; esto ocurre normalmente a una PO_2 de 27 mm Hg. Mientras más alta es la P_{50} , más baja es la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno. Una disminución de la P_{50} indica un desplazamiento hacia la izquierda de la curva de disociación del oxígeno, un aumento de la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno, y un empeoramiento en la liberación de oxígeno hacia los tejidos. La P_{50} está disminuida en presencia de (1) una alta concentración de HbF, la cadena γ a la cual se une pobremente el 2,3-DPG; (2) una hemoglobina modificada, como la metahemoglobina y la carboxihemoglobina; (3) ciertas variantes de hemoglobina, como la Hb Rainier, y (4) reducción del 2,3-DPG en sangre luego de transfusiones masivas (Fig. 36-7). Obviamente, el 2,3-DPG unido a la hemoglobina disminuye la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno (ver adelante). Un desplazamiento hacia la derecha indica una disminución de la afinidad del oxígeno, la cual facilita la distribución del oxígeno en los tejidos. Esto es visto en varios tipos de hipoxia, como ocurre en altitudes elevadas, anemia severa y enfermedades del corazón y de los pulmones.[ref\(1422\)](#)

Afinidad y transporte de oxígeno

La afinidad y el transporte de oxígeno dependen no sólo de la PO_2 (ver arriba) sino también de la temperatura, pH (efecto Bohr), y de la concentración del 2,3-DPG.

Efecto Bohr.

El efecto Bohr expresa el hecho de que la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno varía con el pH. Los protones disminuyen la afinidad de la hemoglobina por la masa de oxígeno y, a la inversa, el oxígeno disminuye la afinidad de la hemoglobina por los protones.



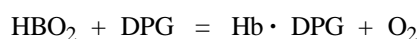
A pH fisiológico en los tejidos, son incorporados alrededor de dos protones por cada cuatro moléculas de oxígeno liberadas; en cambio en los pulmones son liberados nuevamente dos protones al unirse cuatro moléculas de oxígeno a la hemoglobina. Esta acción recíproca es conocida como efecto Bohr y es esencial para el mecanismo del transporte del oxígeno y del sistema buffer del dióxido de carbono (ver capítulo 25).

En el rango fisiológico de pH, la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno disminuye en los tejidos a medida que la acidez aumenta y la curva de disociación se desplaza hacia la derecha (ver Fig. 36-7). El efecto Bohr auxilia en el transporte del oxígeno y en la amortiguación del dióxido de carbono en el medio ácido de los tejidos, en los que se acumulan el dióxido de carbono y los metabolitos ácidos, así como en el medio más alcalino de los pulmones donde el dióxido de carbono es liberado y el oxígeno se incorpora. El efecto Bohr aumenta tanto por el 2,3-DPG como por el cloruro.



2,3-Difosfoglicerato

Otras moléculas influyen en la estructura y función de la hemoglobina. De los factores que afectan la liberación del oxígeno de la hemoglobina (temperatura, pH, PO₂, PCO₂, y 2,3-DPG), el 2,3-DPG es el más importante. Es el intermediario glucolítico más abundante en las células eritrocitarias y está presente en una concentración equimolar con la desoxihemoglobina. En la oxihemoglobina las hélices de las cadenas β no están abiertas lo suficiente como para permitir una unión estereoespecífica firme del 2,3-DPG dentro de la cavidad central del tetrámero de hemoglobina a la valina N-terminal, la histidina H21 (posición 143) y la lisina EF6 (posición 82) de la cadena β. De este modo, la unión del 2,3-DPG estabiliza la forma desoxigenada a expensas de la forma de oxihemoglobina. Esto, junto con otros cambios conformacionales en la molécula oxigenada, favorece más la unión del 2,3-DPG a la forma desoxigenada que a la forma oxigenada, reduciendo la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno y desplazando la curva de disociación del oxígeno hacia la derecha.



Ec.36-2

Durante el metabolismo anaeróbico, las células periféricas aumentan la producción del 2,3-DPG, facilitando la liberación del oxígeno.

Cuando el pH disminuye, como en la acidosis, la curva de disociación del oxígeno se mueve hacia la derecha, pero la inhibición resultante del 2,3-DPG corrige el desplazamiento mediante un cambio igual hacia la izquierda. Un aumento del pH de los eritrocitos desplaza la curva de disociación hacia la izquierda, pero el aumento de la concentración del 2,3-DPG la desplaza hacia la derecha, retornando a la posición basal (ver Fig. 36-7). El denominador común del efecto Bohr-2,3-DPG es la velocidad de la glicólisis, la cual es estimulada por la alcalosis y suprimida por la acidosis debido a que el primero estimula la actividad de la fosfofructocinasa y el último suprime la actividad de la misma. El 2,3-DPG se forma a partir del 1,3-DPG, un intermediario de la vía Embden-Meyerhoff (ciclo de Rappaport-Leubering, ver Fig. 32-2).

Otros derivados químicos de la hemoglobina

Además de la oxihemoglobina y la desoxihemoglobina (ver arriba y en el capítulo 25), existen otras formas químicamente modificadas de la hemoglobina.

Hemoglobina A₁.

La hemoglobina A₁, se forma por la reacción postsintética, no enzimática de varios azúcares con grupos aminos de las cadenas de globina. De hecho, la HbA₁ consiste de cuatro componentes principales, denominados HbA_{1a1}, HbA_{1a2}, HbA_{1b}, y HbA_{1c}. La hemoglobina A_{1c}, el principal derivado de azúcar, es producido por la reacción de la glucosa con el grupo amino terminal (valina) de la cadena β. Las hemoglobinas glucosiladas son útiles para el monitoreo de la diabetes; otras hemoglobinas son los aductos de la glucosa-6-fosfato o fructosa-1,6-difosfato con la cadena β. Ver capítulo 32 para una discusión complementaria sobre hemoglobinas glucosiladas.



Carboxihemoglobina.

El monóxido de carbono (CO) es un ligando que, al igual que el oxígeno, se une reversiblemente al ion ferroso de la hemoglobina. Sin embargo, se forma un compuesto tóxico, la carboxihemoglobina (CO-Hb), que también se une a otras proteínas que contienen el grupo hemo, como la mioglobina, citocromo P-450, y citocromo oxidasa.^{ref(1423)} El CO se combina con la hemoglobina más lentamente que el oxígeno, pero, debido a que la unión es mucho más firme, la liberación del CO es 10,000 veces más lenta que la liberación del oxígeno de la oxihemoglobina. También, la afinidad de la hemoglobina por el CO es 218 veces mayor que la que tiene por el oxígeno. Debido a que tanto el CO como el O₂ compiten por el mismo sitio de unión en el hemo, la presencia de CO disminuye la concentración de oxihemoglobina. A una concentración de CO de 0.1% en el aire inhalado, más del 50% de la hemoglobina no es viable para el transporte de O₂. En la presencia del CO, la oxihemoglobina se disocia más lentamente porque los átomos de hierro no unidos al CO tienen una mayor afinidad por el O₂, causando un desplazamiento de la curva de disociación hacia la izquierda. La CO-Hb puede ser identificada en la sangre por técnicas espectroscópicas, espectrofotométricas, químicas o de cromatografía de gases.^{ref(1424)} La presencia de CO-Hb en sangre no ocasiona un error sustancial en el pulso oximétrico,^{ref(1425)} una determinación que tiene gran importancia química.

Metahemoglobina.

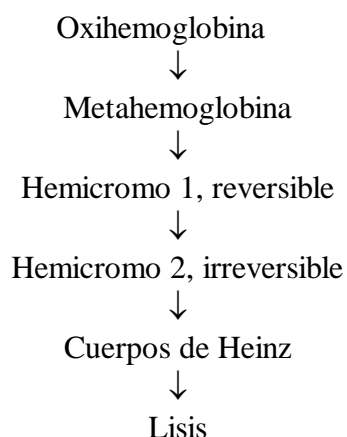
La metahemoglobina (Met-Hb) es una forma de la hemoglobina (con formas oxi o desoxi) en la cual el hierro ferroso (Fe⁺⁺) de la hemoglobina ha sido oxidado al estado férrico (Fe⁺⁺⁺) para formar ferrihemoglobina. La Met-Hb no puede unirse al oxígeno reversiblemente y no es posible que actúe como un transportador efectivo de oxígeno. Si la Met-Hb está presente en concentraciones lo suficientemente altas (por encima del 30% de la hemoglobina total), ocasionará *hipoxia* y *cianosis* (metahemoglobinemia). Normalmente, una pequeña cantidad de metahemoglobina se forma continuamente en los glóbulos rojos; sin embargo, ésta no excede del 1% de hemoglobina total porque la metahemoglobina es reducida a Hb (ver p.728).

Luego de exposiciones prolongadas al aire, la oxihemoglobina en sangre normal se autooxida y la sangre se torna marrón a medida que se forma la metahemoglobina. Este proceso es también responsable del color marrón de la sangre en la orina ácida.

Hemicromos.

Los hemicromos son compuestos férricos verdosos con perfiles espectrales de absorción característicos. Durante la oxidación de la hemoglobina, se forman aniones superóxidos de Met-Hb, y se produce peróxido de hidrógeno. Como resultado, se forma más Met-Hb, y ocurren cambios oxidativos en la proteína globina. Estos cambios, en el grupo hemo y en la proteína, alteran la unión estereoquímica del hemo a la proteína, y el hierro hémico puede formar ligandos con varias cadenas laterales en las proteínas (*hemicromos*) en lugar de hacerlo con la histidina proximal o con el oxígeno. El grupo hemo puede ser desplazado físicamente de la proteína y precipitar como ferrihemo libre (o hematina) en el lado interno de la membrana del eritrocito. Las cadenas polipeptídicas también precipitan cuando son desnaturalizadas. Estos productos de degradación de la hemoglobina forman inclusiones en el interior de la membrana de los eritrocitos, llamados cuerpos de Heinz, los cuales son

reponsables de la lisis de los glóbulos rojos.[ref\(1426\)](#) Los pasos que conducen a la lisis celular son los siguientes:



Los hematólogos utilizan tintas supravitales para identificar los cuerpos de Heinz, los cuales se encuentran en un grupo de anemias conocidas como anemias de los cuerpo de Heinz.

Sulfohemoglobina.

La sulfohemoglobina (S-Hb) es un compuesto estable que resulta de la unión del azufre con la hemoglobina. Los efectos tóxicos de ciertos fármacos en la hemoglobina conducen no sólo a la formación de metahemoglobina, sino también a la producción concomitante de S-Hb.[ref\(1427\)](#) La sulfohemoglobinemia aparece en algunas personas luego de la exposición a sulfonamidas, fenacetina, acetanilida, y trinitrotolueno. No está claro por qué se encuentra Met-Hb en la sangre de algunos individuos, mientras que se observa S-Hb en sangre de otros individuos después de exponerse a estas drogas. No se conoce la estructura de la S-Hb, pero el azufre se encuentra probablemente unido al hemo. El complejo S-Hb es estable e irreversible (de esta manera difiere de la Met-Hb) y no desaparece de la circulación hasta que los glóbulos rojos afectados completen su ciclo de vida. La sulfohemoglobina produce anoxia y cianosis, las cuales son indistinguibles clínicamente de la anoxia y cianosis de la Met-Hb. La sulfohemoglobina muestra una absorción de luz característica a 620 nm que no se desplaza cuando se agrega cianuro. Rara vez, la sulfohemoglobina causa formación de cuerpos de Heinz.

Hemoglobinas Humanas Normales (Tabla 36-1)

Hemoglobina A ($\alpha_2\beta_2$)

La hemoglobina A constituye la porción principal (95% a 98%) del hemolisado adulto. Durante las últimas 6 semanas de vida fetal, se producen pequeñas cantidades de HbA (ver capítulo 40), junto con la hemoglobina fetal predominante. Durante los 6 a 12 meses posteriores al parto, el cambio a la forma adulta de la hemoglobina se completa (ver abajo).

Hemoglobina A2 ($\alpha_2\delta_2$)

La hemoglobina A₂ es un componente menor de la hemoglobina y hace su primera



aparición antes de finalizar el desarrollo intrauterino (0.2% del hemolisado sanguíneo del cordón) y permanece en bajas concentraciones (2.5%) a lo largo de la vida adulta. Su función exacta no se conoce pero probablemente es similar a la HbA.

Hemoglobina fetal ($\alpha_2\gamma_2$)

La hemoglobina F es la hemoglobina principal de la vida fetal, precedida por las hemoglobinas embrionarias Gower 1, Gower 2, y Portland. La HbF es una mezcla de dos especies moleculares en las cuales las cadenas γ tienen tanto glicina (G γ) o alanina (A γ) en la posición 136. En el nacimiento, la relación G γ A γ de la HbF es de alrededor 3:1, mientras que en el adulto normal la relación G γ A γ de la pequeña cantidad de HbF (menos del 1%) es de 2:3. En los primeros meses de vida fetal, se producen pequeñas cantidades de HbF junto con las hemoglobinas Gower, las cuales son reemplazadas por la HbF al final del segundo mes. Desde este momento hasta antes del nacimiento, el porcentaje de hemoglobina fetal es alrededor del 90%. En el nacimiento, los glóbulos rojos sanguíneos contienen alrededor del 70% al 90% de HbF, aunque se han reportado concentraciones mayores. Después del nacimiento, la HbF disminuye rápidamente de 50% a 70% al final del primer mes, de 25% a 60% al final del segundo mes, y de 10% a 30% al final del tercer mes. Entre los 6 meses y los 12 meses, la concentración de la HbF baja del 8% al 2%; en el segundo año baja al 1.8%; y en el tercer año disminuye hasta el 1%. Finalmente la HbF se estabiliza en el adulto a niveles menores que 0.4%, un nivel no cuantificable por los métodos de laboratorio de rutina.

Las funciones y características moleculares de la HbF son las siguientes:

1. Electroforéticamente es más lenta que la HbA
2. Resiste la desnaturalización alcalina, un hecho que es la base de la prueba de Singer para la HbF.[ref\(1428\)](#)
3. Es el doble de resistente a la elución ácida con relación a la HbA, una característica que constituye la base de la técnica de elución de Kleihauer.[ref\(1429\)](#)
4. La HbF es oxidada a Met-Hb dos veces más rápidamente que la HbA, predisponiendo al recién nacido a cianosis.
5. Tiene una mayor afinidad por el oxígeno de la que tiene la HbA, ya que debido a su cadena γ , ésta se une al 2,3-DPG en un grado menor que la hemoglobina adulta. Esta característica permite el transporte de oxígeno a través de la vellosoidad placentaria, a pesar de su baja concentración de oxígeno (80%).[ref\(1430\)](#)

Las propiedades moleculares de la HbF permiten a la HbF funcionar como el principal transportador de oxígeno para el feto. Las otras hemoglobinas fetales presentan propiedades similares y tienen la posibilidad de combinarse con el oxígeno a tensiones bajas de oxígeno y a bajo pH del fluido intersticial, facilitando el crecimiento y el desarrollo fetal. Las hemoglobinas embrionarias son cuantificables en los eritrocitos mediante una modificación del método de Kleihauer para la HbF.

Condiciones Patológicas

Hemoglobinopatías



Los desordenes heredados de la hemoglobina, las *hemoglobinopatías*, son alteraciones genéticas que involucran la estructura y síntesis de una o más de las cadenas polipeptídicas de la globina. Las hemoglobinopatías pueden dividirse en varios grupos superpuestos^{ref(1431)}: (1) las diferentes estructuras de las hemoglobinas que involucran sustitución, adición, o supresión de uno o más aminoácidos de la cadena de globina; (2) las *talasemias*, un grupo de desórdenes en los que hay un defecto cuantitativo en la producción de la cadena de globina; (3) combinaciones de tipos 1 y 2 que resultan en hemoglobinopatías complejas; y (4) la persistencia hereditaria de hemoglobina fetal, un desorden asintomático.

Variantes estructurales de la hemoglobina

Nomenclatura.

Las hemoglobinas A, F, y S fueron las primeras hemoglobinas en ser descubiertas y fueron nombradas con letras. A medida que fueron descubiertas las variantes adicionales, se les asignaron sucesivamente letras del alfabeto comenzando con HbC. Posteriormente, las hemoglobinas fueron descubiertas tan rápidamente que las letras del alfabeto se agotaron. Por lo tanto, las hemoglobinas con movilidad electroforética similar, pero con diferentes estructuras fueron distinguiéndose por la adición (correctamente como un subcripto) del lugar de descubrimiento de la nueva hemoglobina, como HbC_{Georgetown} y HbD_{Punjab}. Finalmente, algunas hemoglobinas son llamadas por los nombres de las familias en las cuales fueron descubiertas por primera vez, tal como HbLepore. Cuando se determinó la sustitución exacta de aminoácidos de la nueva variante y la estructura espacial de la hemoglobina, la expresión se tornó más compleja. Por ejemplo, la HbS se convirtió en designación científica: HbS B6 (A3) Glu \rightarrow Val. Esta denominación revela que la sustitución está localizada en la sexta posición de la secuencia de aminoácidos, en la posición A3 de la cadena α . Esta nomenclatura también muestra que la glutamina (Glu) ha sido reemplazada por una valina (Val). Actualmente existen aproximadamente 500 variantes de hemoglobinas identificadas. Algunas de las más importantes que manifiestan desórdenes clínicos se muestran en la Tabla 36-2.

En la referencia 10^{ref(1432)} se encuentran excelentes tablas sobre nomenclatura, estructura molecular, manifestaciones clínicas, y movilidad electroforética de las variantes de hemoglobina

Clasificación

Las variantes de hemoglobina son clasificadas de acuerdo a (1) mecanismos moleculares; (2) manifestaciones clínicas y funcionales; (3) comportamiento electroforético.

Mecanismos moleculares responsables de las variantes estructurales de hemoglobinas.

Cinco mecanismos moleculares básicos son responsables de los cambios estructurales encontrados en la mayoría de las variantes de hemoglobina: (1) sustitución de aminoácidos, (2) supresiones e inserciones, (3) entrecruzamiento desigual (fusión de genes), (4) elongación de la cadena, y (5) desplazamiento del marco de lectura.^{ref(1433)}

Consecuencias clínicas de las alteraciones estructurales de las moléculas de



hemoglobina.

Las alteraciones estructurales de la molécula de hemoglobina son responsables de un amplio rango de manifestaciones clínicas. La mayoría de las mutaciones son asintomáticas porque éstas no interfieren con la función de la hemoglobina. Otras producen enfermedades porque afectan la estabilidad, forma, o función de la molécula de hemoglobina. Una persona homocigota para una hemoglobina anormal puede tener manifestaciones clínicas severas tales como la anemia falciforme, mientras que una persona heterocigota para una hemoglobina anormal (HbA-HbS) es generalmente asintomática. Algunas hemoglobinas (HbC, HbD, HbE) aún en los estados homocigóticos producen síntomas leves, mientras que otras son responsables cambios patofisiológicos casi específicos, como cianosis y eritrocitosis.

Los desórdenes clínicos pueden ser agrupados como se muestra adelante [ref\(1434\)](#) (Tabla 36-2).

Anemias hemolíticas. Las HbS y HbC pueden formar cristales intraeritrocíticos y causar deformación de los glóbulos rojos sanguíneos. Tales deformaciones son reconocidas fácilmente mediante el microscopio de luz, como las células de la anemia falciforme. Las hemoglobinas inestables y las anormalidades enzimáticas en la desviación de monofosfatos de hexosa son también responsables de las inclusiones de los cuerpos de Heinz intraeritrocitarios. Las células afectadas son destruidas prematuramente en el bazo, lo que resulta en una vida media muy corta de los eritrocitos.

Cianosis. La sustitución de aminoácidos cerca de la cavidad del hemo produce hemoglobinas M, las cuales causan metahemoglobinemia y cianosis. La cianosis puede también deberse a mutantes de hemoglobina que provocan aumento de la desoxihemoglobina, como Hb Kansas y Hb Beth Israel. Ambos tipos de hemoglobina muestran una afinidad reducida por el oxígeno.

Eritrocitosis. La sustitución de aminoácidos provoca una alta afinidad por el oxígeno e hipoxia tisular. Debido a la hipoxia, se estimula la síntesis de eritropoyetina, dando lugar a una producción aumentada de células eritrocíticas (eritrocitosis). Son ejemplos de este trastorno Hb Rainer, Hb Chesapeake, y Hb Ypsilanti.

Anemias hipocrómicas. La mutación reduce la producción de hemoglobina. Como ejemplos están la Hb Lepore y Hb Constant Spring.

Comportamiento electroforético de la hemoglobina.

La electroforesis de hemoglobina es el análisis de laboratorio más importante usado para diagnosticar y clasificar una anormalidad de la hemoglobina (ver pág. 732). Sin embargo, una sola prueba no puede distinguir con exactitud una hemoglobina anormal de un desorden como la talasemia.

Alteraciones de las células falciformes: hemoglobina falciforme

Los desórdenes falciformes son causados por formas homocigotas del gen de la célula falciforme (anemia falciforme), por forma heterocigota del gen de la célula falciforme (rasgo de la célula falciforme), y por combinación con otras variantes estructurales de hemoglobina o talasemias.

La hemoglobina falciforme (HbS) surge cuando la valina es substituida por un residuo normal de glutamina, y los cristales de la forma HbS desoxigenada originan la forma

falciforme de los eritrocitos.

La HbS no es la única hemoglobina que hace que los eritrocitos se vuelvan falciformes, ya que las células eritrocíticas que contienen HbC Georgetown, HbI, y Hb Bart's también se transforman en falciformes. No obstante, en América y en África, la HbS es la variante de hemoglobina más común, con una incidencia de las formas heterocigotas de aproximadamente 8% en negros Americanos y el 30% en negros Africanos. La HbS puede también encontrarse en habitantes no negros en las áreas que bordean a África. En África la alta frecuencia del gen de célula falciforme ha persistido porque los heterocigotos para HbS están protegidos en cierta medida de la malaria debido a que los organismos *Plasmodium* no pueden crecer en glóbulos rojos que contienen HbS.[ref\(1435\)](#)

Mecanismo molecular de los trastornos falciformes

La sustitución de valina por el ácido glutámico normal en la posición 6 de la cadena α de globina resulta en una hemoglobina cuya forma desoxigenada (desoxi-HbS) polimeriza dentro de los glóbulos rojos y forma largas fibras fácilmente visibles por microscopía electrónica de eritrocitos de pacientes homocigotos para la mutación α^S . La oxihemoglobina S *no* forma tales fibras.

Algunos hechos acerca de la polimerización son relevantes para la patogénesis de la configuración falciforme y por ende para una posible intervención terapéutica. La polimerización tiene lugar en dos fases. La primera de éstas, la fase de nucleación lenta (o “retardada”), refleja la asociación inicial de unas cuantas moléculas de desoxi-HbS. Esta fase varía en duración desde milisegundos hasta pocos minutos, dependiendo de varios factores, incluyendo la temperatura y la presencia de hemoglobinas diferentes de la HbS.

La duración también depende, exponencialmente, de la concentración de HbS. De este modo, un tiempo de retraso prolongado, que resulta de una concentración disminuida de HbS en los glóbulos rojos, podría permitir a la célula desoxigenada atravesar la microcirculación sin tornarse falciforme. Los factores que favorecen el aumento de la polimerización de la HbS en los glóbulos rojos y por tanto de la severidad de la enfermedad, ejercen su efecto mediante el aumento en la abundancia relativa de la HbS-desoxi. Tales factores incluyen un descenso en la PO_2 , aumento de fosfatos orgánicos, aumento en la concentración de protones, y aumento de temperatura.[ref\(1436\)](#) La variación en la severidad clínica de los diferentes síndromes falciformes está representada en la Tabla 36-3.

Patofisiología de la enfermedad de célula falciforme

La HbS es heredada como un rasgo codominante autosómico. Las células con forma falciforme bloquean la circulación temporal o permanentemente, y el estado resultante conduce a hipoxia e infartos isquémicos de varios órganos incluyendo hígado, riñones, bazo, pulmones, corazón, huesos, y sistema nervioso. Tales infartos conducen al aumento de morbilidad y, si están localizados en un área vital, causan la muerte.[ref\(1437\)](#) El revestimiento endotelial vascular, dañado por falta de oxígeno, atrae plaquetas, las cuales inician el proceso de coagulación intravascular diseminada.[ref\(1438\)](#)

Las células falciformes tienen un lapso de vida sumamente reducido. La anemia hemolítica resultante está aumentada por la incapacidad de la médula ósea para responder

adecuadamente a la anemia debido a una eritropoyesis ineficaz. El aumento en la destrucción de los glóbulos rojos es responsable de la hiperbilirrubinemia, reticulocitosis, hiperplasia eritroide de la médula ósea, piedras coloreadas de la vejiga, y osteoporosis como resultado de la expansión de la médula ósea.

Las células falciformes muestran anomalías en el transporte de oxígeno.[ref\(1439\)](#) En las células falciformes la curva de disociación del oxígeno está desplazada hacia la derecha. La reducida afinidad por el oxígeno que causa este desorden favorece la liberación de oxígeno a altas presiones de oxígeno, pero también propicia la formación de desoxihemoglobina y de falciformismo.[ref\(1440\)](#) El desplazamiento del equilibrio del oxígeno hacia la derecha es causado por un aumento en la concentración del 2,3-DPG y por un defecto mediado por la polimerización de la HbS.

Rasgos de la célula falciforme (HbAS)

Las personas con rasgos celulares falciformes son generalmente asintomáticos y tienen un hemograma normal (perfil celular de los glóbulos rojos, incluyendo conteo de glóbulos rojos, volumen corpuscular medio [VCM], hemoglobina corpuscular media [HCM]) y supervivencia de los glóbulos rojos). La demostración de la presencia de HbS usualmente no tiene importancia clínica, ya que un gen de HbA normal ha sido heredado junto con el gen de HbS, pero debería indicar la necesidad de acudir a un asesoramiento genético. Hay pocas historias de complicaciones de falciformismo en pacientes con HbAS. Estos incluyen (1) hematuria espontánea en alrededor del 3% de los pacientes y más frecuentemente hipostenuria debido al daño en la capacidad de los riñones para concentrar, ambos signos señalan falciformismo en los vasos sanguíneos de la médula; (2) ruptura del bazo infartado; (3) crisis falciformes en altitudes elevadas; y (4) rara vez, retinopatía proliferativa. Recientemente, un estudio grande en personal militar con rasgos celulares falciformes que estaba bajo entrenamiento básico, mostró un aumento significativo de muerte súbita.[ref\(1441\)](#) No se conoce la causa exacta de esto en los individuos con el rasgo de célula falciforme.

Anemia falciforme (HbSS)

La anemia falciforme es una anemia hemolítica crónica, de moderada a severa, en una persona homocigota para HbS que haya heredado el gen HbS de ambos padres. El descubrimiento de la HbSS es útil para diferenciar la anemia falciforme de la α -talasemia de células falciformes o de la persistencia hereditaria de HbS o de HbF. La enfermedad no es evidente en el nacimiento y no se manifiesta en sí hasta que las cadenas β del recién nacido son reemplazadas por las cadenas β^S después de los 3 a 6 meses de vida.

La severidad clínica de la enfermedad de la HbSS varía de paciente a paciente. Dicha variación ha sido posteriormente clarificada por la investigación de los haplotipos. Estas variaciones genéticas (Benin, Bantu, Senegal) son de interés hematológico, genético, y antropológico, ya que ofrecen conocimiento nuevo en los desórdenes falciformes.[ref\(1442\)](#) Las manifestaciones clínicas pueden dividirse en episodios agudos y crónicos. Los problemas agudos resultan de crisis de oclusión vascular involucrando diversas áreas, así como también crisis hematológicas agudas (ver cuadro adelante).

La crisis del bazo puede surgir de la captura repentina de sangre en el bazo. Las



manifestaciones crónicas de la enfermedad falciforme generalmente aparecen luego de la infancia media. Esto incluye alteraciones en el crecimiento y desarrollo, enfermedades óseas y articulares, y daños orgánicos que involucran los sistemas cardiovascular, pulmonar, hepatobiliar, genitourinario, ocular, y dermatológico. La falla renal puede ocurrir en algunos pacientes con anemia falciforme, probablemente como resultado de enfermedad capilar glomerular.

Los valores de hemoglobina permanecen fijos en 70 a 80 g/L acompañados por una reticulocitosis muy elevada (10%). El perfil electroforético de la hemoglobina muestra ausencia de HbA (sin cadenas-(A), 80% a 95% de HbS, 2% a 4% de HbA2, y 2% a 20% de HbF. Tres hallazgos bioquímicos relevantes incluyen hiperuricemia en pacientes con la función tubular alterada, bajos niveles de zinc en plasma, glóbulos rojos, y cabello; altos niveles de lactato deshidrogenasa en pacientes en crisis. El tratamiento de la anemia HbSS está diseñado para (1) inhibir la polimerización de HbS, (2) disminuir los niveles intracelulares de Hb total, y (3) aumentar la concentración de HbF. La hidroxiurea ha sido el agente farmacológico más efectivo para influir en el aumento de la producción de HbF y en la disminución del falciformismo.

Manifestaciones Clínicas Agudas de la HbSS
Hematológica
Anemia hemolítica acelerada
Anemia megaloblástica
Crisis aplástica
Oclusión vascular
Hueso y articulaciones
Abdomen, bazo
Pulmones
Sistema nervioso central
Espalda

Enfermedad de la célula falciforme HbC

La enfermedad falciforme-HbC tiene una incidencia relativamente alta (1:833 nacimientos entre negros en los Estados Unidos) porque las HbSs y HbCs son variantes comunes de la hemoglobina. El paciente hereda un gen anormal de cada padre, y la enfermedad resultante es una anemia hemolítica de suave a moderada, asociada con las mismas complicaciones de vasooclusivas observadas en la enfermedad falciforme. Sin embargo, estas complicaciones generalmente ocurren con una baja frecuencia. Debido a que los genes en esta enfermedad son mutaciones alélicas de la cadena α , no se forma ninguna cadena α y la HbA está ausente.

Los frotis de sangre periférica revelan algunas *células blanco*, células falciformes, y glóbulos rojos poco frecuentes con cristales rectos o curvados. El rango de valores de la



hemoglobina va desde 100 a 130 g/L, únicamente con bandas de HbC y HbS detectadas en la electroforesis. El conteo de reticulocitos varía de 3% a 10%.

Rasgo y enfermedad de la HbC

El rasgo HbC (HbAC) afecta alrededor del 3% de los negros Americanos. Esta es asintomática, y la sangre periférica es aparentemente normal, excepto por unas pocas células blanco. Los patrones electroforéticos muestran alrededor del 30% al 40% de HbC, del 50% al 60% de HbA, del 3% al 4% de HbA₂, y 7% de HbF.

Enfermedad de la hemoglobina C (HbCC)

La forma homocigota es poco común, es asintomática y ocurre en 1 de cada 10,000 negros Americanos.

Rasgo y enfermedad de la hemoglobina E

La variante de la HbE, o B26 Glu → Lys, es la segunda anormalidad de la hemoglobina más común en todo el mundo. Debido a la gran migración de refugiados del sureste de Asia, se han registrado un número creciente de pacientes con HbE en los Estados Unidos. El rasgo de la HbE, aunque silencioso clínicamente, muestra microcitosis moderadamente severa, sin anemia. La cantidad de HbE en el rasgo HbE es de 30% a 35%. Esta es más baja de lo esperado para una condición heterocigótica; por ejemplo, se observa el 45% de la HbS en pacientes con rasgo de célula falciforme. Esta discrepancia se atribuye al defecto de tipo talasemia del gen de la HbE.

Los pacientes con la enfermedad de la HbE muestran una anemia microcítica, monocromática leve con algunas células blanco, que le confieren un fenotipo talasémico.

Debido a que algunos habitantes del sureste asiáticos tienen anormalidades genéticas talasémicas α y β , las combinaciones de la HbE con estos genes se vuelven clínicamente mucho más significativas. Por ejemplo, pacientes con talasemia HbE- α ⁰ tienen una anemia significativa y requieren transfusiones; una situación clínica similar a la que se observa en la talasemia intermedia.[ref\(1443\)](#)

Desorden de la hemoglobina inestable

Las hemoglobinas inestables son variantes estructurales de la HbA, en la cual la hemoglobina mutante es menos estable que la hemoglobina normal. Se han demostrado aproximadamente 150 variantes inestables de la HbA en pruebas in vitro. Sin embargo, únicamente se ha observado que 70 tienen manifestaciones clínicas importantes, generalmente hemólisis.[ref\(1444\)](#) La alteración molecular responsable de la inestabilidad de la hemoglobina produce una serie de efectos patofisiológicos que pueden evaluarse por métodos de laboratorio, si bien éstos no se expresan de la misma manera por todas las hemoglobinas inestables. Estas son (1) anemia hemolítica, (2) producción aumentada de metahemoglobina y sulfohemoglobina, (3) formación hemicrómica, (4) formación de inclusiones de cuerpos (Heinz), (5) disociación alterada del oxígeno, (6) sensibilidad a fármacos, (7) movilidad electroforética alterada (poco frecuente), (8) respuesta alterada a las pruebas de estabilidad de



la hemoglobina, y (9) paso de orina oscura. La orina profundamente pigmentada es causada por la mesobilifusina, un dipirrol derivado del catabolismo de los cuerpos de Heinz o del hemo libre. [ref\(1445\)](#)

Talasemias

Definiciones

Las talasemias son hemoglobinopatías heredadas que dan como resultado una velocidad disminuida en la producción de una o más cadenas de globina de la hemoglobina. [h refs\(1446\)](#) Estas son hemoglobinopatías cuantitativas que difieren de las hemoglobinopatías cualitativas por el hecho de que la estructura de la cadena de globina afectada (o cadenas) es normal, pero su síntesis está reducida o ausente. La síntesis disminuida de hemoglobina resulta en un descenso de la hemoglobina, hipocromía, microcitosis de los glóbulos rojos, y un grado variable de hemólisis.

La síntesis defectuosa de un grupo de cadenas de globina causa una producción en exceso del par no afectado [ref\(1447\)](#) (síntesis desbalanceada de cadenas de globina), que precipitan en los glóbulos rojos en la forma de cuerpos de inclusión, causando hemólisis.

Clasificación

La clasificación más antigua de talasemias como *talasemia principal*, *intermedia*, *menor*, y *mínima* describe la severidad clínica del desorden y no considera el carácter genético. La clasificación genética es preferida y está basada en la cadena polipeptídica deficiente particular. En la α -talasemia, la síntesis de las cadenas α está disminuida, en la β -talasemia, la síntesis de las cadenas β está disminuida. Las formas principales de la talasemia están representadas en la Tabla 36-4.

Las talasemias que involucran los genes α , β o δ (pueden conducir a la muerte fetal o embrionaria. [ref\(1448\)](#) Una condición de tipo talasémica que es asintomática es la persistencia hereditaria de la hemoglobina fetal (PHHF). La herencia de talasemia es autosómica y es similar a la HbS. Desde el punto de vista clínico, ésta es recesiva porque la forma heterocigota es asintomática. Al igual que el gen HbS (α^S), el gen de la talasemia puede expresarse a sí mismo en estados homocigotos, heterocigotos, y doblemente heterocigotos.

El rango clínico varía desde una condición normal a una severa, potencialmente fatal y puede incluir un retraso en el crecimiento, hepatomegalia, sobrecrecimiento óseo, dolor óseo, e ictericia.

Alfa talasemias

Las alfa (α)-talasemias son un grupo de desórdenes genéticos que causan la síntesis defectuosa de la cadena α . Las α -talasemias son más difíciles de diagnosticar debido a que no se observan las elevaciones características en HbA₂ o HbF de las β -talasemias. La síntesis disminuida de la cadena α abate la producción de HbA, HbF, y HbA₂ debido a que éstas contienen cadenas α , y esto conduce a un exceso de cadenas β y δ , las cuales polimerizan dando lugar a las formas tetraméricas β_4 (Hb de Bart) y δ_4 (HbH). La presencia de estas



hemoglobinas es la marca distintiva de la α -talasemia. Las cuatro α -talasemias clásicas incluyen el rasgo de la α -talasemia-2 (portador silencioso) en el cual uno de los cuatro loci del gen de la α -globina es deficiente; el rasgo de la α -talasemia-1 (anemia hipocrómica leve) con dos loci disfuncionales; la HbH (anemia hemolítica moderadamente severa) con tres loci afectados; y la Hb Bart's (hidropesía fetal incompatible con la vida) en la cual los cuatro loci son afectados. La α -talasemia puede también surgir de la producción de la Hb Constant Spring (HbCS). Esta hemoglobina es el resultado de una mutación en el codón terminal de la porción 3' del AND, que normalmente interrumpe la producción de la cadena α . Por lo tanto, las HbCS contienen 172 aminoácidos en la cadena α en lugar de 141. La producción de esta cadena α alargada causa una interacción alterada de las cadenas α en relación a las cadenas no α , resultando en una condición talasémica (Tabla 36-4).

Beta talasemias

Las beta (β)-talasemias son un grupo de desórdenes genéticos que resultan en una síntesis disminuida (talasemias β^+ y β^{++}) o ausente (talasemia- β^{++}) de la cadena β . Estos trastornos son heredados como una multitud de combinaciones genéticas responsables de un grupo heterogéneo de síndromes clínicos. Al igual que la α -talasemia, la β -talasemia es transmitida como una característica recesiva autosómica mendeliana. La producción de las cadenas β está reducida o ausente debido a un defecto en la transcripción de los genes de β -talasemia. Actualmente, las mutaciones puntuales que dan lugar a las diversas β -talasemias son aproximadamente 90. La principal β -talasemia, también conocida como Anemia de Cooley, o β -talasemia homocigota, es un desorden clínicamente severo causado por la herencia de dos alelos de β -talasemia, uno en cada copia del cromosoma 11. La anemia hipocrómica de la talasemia principal es tan severa que generalmente se requieren transfusiones de sangre por el resto de la vida del paciente.

Las β -talasemias están ampliamente distribuidas por todo el mundo pero ocurren más frecuentemente en la población Mediterránea; esto también se presenta en el sureste de Asia del, medio oriente, India, y Pakistán. En los Griegos y negros Americanos la β^+ -talasemia es la más común, mientras que en Italia es predominante la β^0 .

La β -talasemia heterocigota, ya sea β^+ o β^0 , es un desorden asintomático que puede o no estar asociada con un grado leve de anemia.[ref\(1449\)](#) Esta es la talasemia más comúnmente encontrada en Norteamérica.[ref\(1450\)](#) Característicamente hay una eritrocitosis de suave a moderada de glóbulos rojos deficientes en hemoglobina. El volumen corpuscular medio (VCM) y la hemoglobina corpuscular media (HCM) se encuentran siempre considerablemente disminuidos. El contenido de la HCM es variable.

Los estados del portador heterocigoto también han sido llamados talasemia menor y talasemia mínima. La designación de talasemia intermedia describe las manifestaciones clínicas de una forma de β -talasemia más severa que la definida por los rasgos genéticos y más leve que la forma homocigota.

La β^0 -talasemia homocigota conduce a la supresión completa de la síntesis de la cadena β y a la ausencia completa de HbA. Esta es la causa de una severa anemia letal hemolítica dependiente de transfusión, acompañada por hallazgos clínicos y hematológicos característicos. La β^+ -talasemia homocigota es un desorden heterogéneo que, en base a la



cantidad de HbA sintetizada, es clasificada más adecuadamente en tres tipos principales. El tipo 1, en el que se sintetiza del 5% al 15% de HbA, es la forma mediterránea y oriental caracterizada por una anemia severa dependiente de transfusión. El tipo 2, de antecedentes africanos, tiene 20% a 30% de HbA y es responsable de una enfermedad leve. El tipo 3 conduce a una forma leve de talasemia intermedia.[ref\(1451\)](#)

El embarazo puede conducir a una anemia severa en pacientes con rasgo de talasemia.[ref\(1452\)](#) El patrón electroforético de la hemoglobina muestra una HbF ligeramente elevada (1% a 7%) en el 50% de los casos y un aumento en el diagnóstico de A₂ (3.5% a 7.5%).[ref\(1453\)](#) La distribución de la HbF en los glóbulos rojos demostrada por la técnica de elución ácida revela un patrón heterogéneo.

Persistencia hereditaria de la hemoglobina fetal (PHHF)

La PHHF consiste de un grupo de condiciones poco comunes caracterizadas por la síntesis continua de altos niveles de la HbF en la vida adulta. No se observa ningún efecto perjudicial en los pacientes, y esta ausencia apoya el concepto de que la prevención o la reversión del cambio de la hemoglobina fetal a la hemoglobina adulta podría beneficiar a los pacientes con anemia falciforme y α -talasemia. Se considera que es una forma de α -talasemia[ref\(1454\)](#) debido a que la persistencia de la síntesis de la cadena α compensa la deficiencia de producción de las cadenas α y β .

Existen dos tipos principales de PHHF: (1) pancelular y (2) heterocelular. El tipo pancelular tiene niveles muy altos de la síntesis de hemoglobina fetal y una distribución uniforme de la HbF entre los glóbulos rojos. Ésta puede dividirse de nuevo por el tipo de mutaciones en las formas supresiva y no supresiva. La PHHF muestra diferencias étnicas en donde los negros con enfermedad supresiva pancelular heterocigota tienen rangos de HbF entre 15% y 35% y contienen cadenas β^{Gly} y β^{Ala} en una relación de 2:3. Por otro lado, los griegos con PHHF no supresiva pancelular muestran niveles de HbF más bajos (10% a 20%) y contienen 90% de β^{Ala} .[ref\(1455\)](#)

Unos pocos pacientes negros pueden tener PHHF homocigota. Toda la Hb que se encuentra dentro del eritrocito es HbF. Estos pacientes muestran eritrocitos hipocrómicos microcíticos moderados pero no anemia.

La PHHF α -talasemia es similar al rasgo de la α -talasemia, excepto porque presenta una mayor proporción y distribución regular de la HbF en los glóbulos rojos.[ref\(1456\)](#) Algunos pacientes con PHHF- α -talasemia pueden tener una condición clínica más severa similar a la talasemia intermedia.

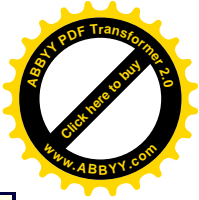
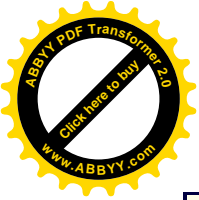
La PHHF heterocelular parece ser el resultado de mutaciones fuera del agrupamiento génico de globina y resulta en un aumento variable del número de las células F. Los niveles de HbF son generalmente menores que los correspondientes a las formas paracelulares.

Metahemoglobinemia

La metahemoglobinemia se clasifica en formas adquirida y heredada.

Metahemoglobinemia adquirida.

Los individuos normales desarrollan metahemoglobinemia después de la exposición a



agentes que aumentan la producción de metahemoglobina excediendo la capacidad de las vías reductoras de metahemoglobina. La mayoría de los agentes capaces de producir metahemoglobinemia son compuestos aromáticos que contienen grupos funcionales amino, hidroxilo, o nitro. Algunos de los agentes responsables de la metahemoglobinemia incluyen nitritos, nitratos, sulfonamidas, tintas de anilina (marcadores de lavandería), acetanilida, fenacetina, y Pyridium (clorhidrato de fenazopiridina). Los nitritos y nitratos son responsables de la mayoría de los casos. La sangre puede ser de color chocolate marrón. Los síntomas varían en intensidad, dependiendo del nivel de metahemoglobina.

Metahemoglobinemia heredada.

La metahemoglobinemia heredada puede subdividirse en dos formas: una que resulta de las mutaciones que originan una deficiencia en la NADH metahemoglobina reductasa, y la otra que resulta en la acumulación de hemoglobina M debido a una sustitución de un aminoácido en la cadena de globina que estabiliza la metahemoglobina, haciéndola resistente a una reducción posterior.

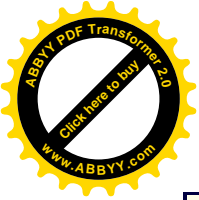
Existen cuatro vías metabólicas para la reducción de la metahemoglobina a hemoglobina.[ref\(1457\)](#) (1) La vía de la NADH metahemoglobina reductasa, (2) la vía inversa de la (NADPH) metahemoglobina reductasa, (3) la reducción por el ácido ascórbico, y (4) la reducción por el glutatión reducido. La metahemoglobinemia causada por una deficiencia heredada de NADH metahemoglobina reductasa es transmitida como un rasgo recesivo autosómico. Las hemoglobinas M muestran un patrón hereditario recesivo y, a diferencia de algunas hemoglobinopatías, no produce anemias hemolíticas. La mutación causa la formación de una metahemoglobina anormalmente estable. Esta estabilidad es atribuible a la sustitución de aminoácidos dentro o cerca de la cavidad del hemo, lo que resulta en un enlace directo de la globina con el hemo. La tirosina es sustituida por histidina en o a lo largo del sitio de unión del hemo en varias de las hemoglobinas M. La HbM^{Iwate} y M^{Boston} tienen esta sustitución en la cadena α , mientras que la HbS M^{Hyde Park} y M^{Saskatoon} la presentan en la cadena β . La metahemoglobina raramente excede del 25% al 30% en estos individuos. Si las cadenas α están involucradas, se puede presentar la cianosis al nacimiento, mientras que las sustituciones de la cadena β son responsables de la cianosis en los últimos meses del embarazo debido a la aparición posterior de estas cadenas.[ref\(1458\)](#)

Clínicamente, los pacientes con metahemoglobinemia heredada tienen eritrocitosis y cianosis de pizarra gris desde el nacimiento, la cual no está asociada con la enfermedad cardiopulmonar. Concentraciones de metahemoglobina de 10% a 20% del total de la hemoglobina producen cianosis pero no otros efectos de enfermedad. Las concentraciones de la metahemoglobina del 30% son responsables de los dolores de cabeza y dificultad para respirar, mientras que las concentraciones del 70% o por encima pueden ser fatales. Puede observarse, en casos de metahemoglobinemia, una baja incidencia de retardo mental y muerte temprana causada por una deficiencia de la NADH metahemoglobina reductasa, una enfermedad que ayuda en sí al diagnóstico prenatal.[ref\(1459\)](#)

Cambio del Compuesto Analizado en la Enfermedad

Interpretación de los valores de la hemoglobina

La media y los intervalos de referencia para la hemoglobina en adultos saludables son
1502



de 151 (136 a 165) g/L para hombres y 135 (120 a 150) g/L para mujeres. Los valores de hemoglobina varían enormemente para los recién nacidos, infantes, niños hasta la pubertad, y adultos (Tabla 36-5).

Las concentraciones de hemoglobina están afectadas por variaciones fisiológicas y procesos patológicos. Las variaciones fisiológicas incluyen edad, sexo, ejercicio físico, postura, deshidratación, y altitud. El efecto la edad es fácilmente apreciable en la Tabla 36-5. Durante la pubertad el nivel de hemoglobina masculina aumenta por encima del valor femenino secundario a la influencia de testosterona. El ejercicio fuerte aumenta el nivel de hemoglobina probablemente debido a la pérdida de líquidos, y también se experimenta un aumento transitorio después de que uno cambia de la posición recostado a la posición de pie. La deshidratación es responsable de un aumento en la concentración de hemoglobina de tal magnitud que puede enmascarar una anemia significativa. Una elevada altitud es responsable de niveles de hemoglobina elevados debido al efecto de hipoxia estimulador de eritropoyetina.

Hay tres causas principales de anemia: producción alterada, destrucción aumentada, y pérdida excesiva de sangre. La producción alterada ocurre con anemias aplásticas; la destrucción aumentada ocurre con la anemia hemolítica; y la pérdida excesiva de sangre ocurre generalmente en anemia por deficiencia de hierro. El conteo de reticulocitos está disminuido generalmente en la deficiencia crónica de hierro, reflejando el efecto del hierro ausente en la eritropoyesis.

Los valores aumentados de hemoglobina se encuentran en policitemia vera, eritrocitosis, deshidratación, enfermedades cardíacas y pulmonares crónicas en recién nacidos, altitudes considerables, quistes renales, y numerosos tumores productores de eritropoyetina.

HbF

En adultos normales, la concentración de las células F es bastante constante de 0,2% a 0.7%, pero hay condiciones hematológicas, genéticas y adquiridas en las cuales la concentración está aumentada. Los desórdenes genéticos incluyen talasemias (α y β), persistencia hereditaria de HbF, anemia falciforme, y variantes inestables de la cadena α . Las condiciones adquiridas incluyen embarazo en la mitad del período, recuperación de una depresión de la médula ósea, [ref\(1460\)](#) leucemias (los valores más altos están en la leucemia mielocítica crónica juvenil negativa al cromosoma Filadelfia), tirotoxicosis, y hepatoma. [refs\(1461\)](#)

HbA_{1c}

Los niveles de HbA_{1c} dependen de los niveles de glucosa en sangre integrales de tiempo. Ver capítulo 32 para una discusión más detallada. Los niveles de HbA_{1c} se encuentran disminuidos en la anemia hemolítica porque la vida de los glóbulos rojos está acortada por lisis [ref\(1462\)](#) y en las hemoglobinopatías en las que la HbA está disminuida (aunque el porcentaje de HbA_{1c} con relación a HbA total puede ser normal).

Carboxihemoglobina (CO-Hb)

Algunas carboxihemoglobinas son producidas endógenamente cuando 1 mol de CO es generada por degradación de 1 mol de hemo a bilirrubina (ver capítulo 35). A pesar de que esta producción endógena de carboxihemoglobina puede presentar un riesgo cuando el aire



exhalado está concentrado en espacios pequeños y mal ventilados, es un hecho extensamente documentado que la generación exógena de CO a partir de la combustión del material orgánico dentro de espacios confinados causa intoxicación. El CO exógeno se deriva del tubo de escape de los automóviles y de los contaminantes industriales tales como gas de carbón mineral, carbón vegetal ardiente, y humo de tabaco. En ausencia del CO exógeno, la concentración de la CO-Hb endógena es de 0.2% a 0.8%. Los niveles de CO-Hb pueden encontrarse elevados en las anemias hemolíticas,[ref\(1463\)](#) y en los fumadores la CO-Hb puede variar desde un 4% a un 20%. En los fumadores que tienen una gran exposición al CO, el nivel promedio puede ser del 10%.

Debido a la unión firme del CO a la hemoglobina, una larga exposición aun a bajas concentraciones de CO puede causar acumulaciones tóxicas en las cuales los órganos más dependientes del oxígeno, como el cerebro y el corazón, son los más susceptibles. Síntomas leves tales como un dolor de cabeza y dificultad respiratoria suaves al hacer ejercicio pueden ocurrir a niveles de 10% a 15% de saturación. A niveles de 20% a 30%, los dolores de cabeza serán más severos y estarán acompañados por una visión y juicio deteriorados. Los niveles por encima del 50% causan el aumento de síntomas severos, coma, y convulsiones, y niveles del 60% o más son generalmente fatales, aunque se han reportado casos fatales a niveles tan bajos como el 20%. La vida media de eliminación del CO es de alrededor 4 horas para una persona que respira aire atmosférico, pero en fumadores el nivel puede permanecer alto.[ref\(1464\)](#) La exposición crónica al CO puede ser la responsable de una policitemia relativa.[ref\(1465\)](#) La carboxihemoglobina produce un color rojo cereza en sangre y piel. Algunas veces la sangre puede tener un tinte violeta debido a la presencia simultánea de cantidades moderadas de hemoglobina reducida. La exposición a niveles tóxicos del CO es tratada con oxígeno, a menudo a presiones elevadas (tratamiento hiperbárico), para desplazar el CO de la hemoglobina. Ambas, exposición y terapia, son seguidas atentamente por análisis de gas en sangre para la CO-Hb.

Saturación de oxígeno

Clínicamente, la saturación de oxígeno es usada como un indicador de hipoxia e hiperoxia tisular. La hipoxia tisular es producida por un contenido de aire inspirado con poco oxígeno, como en altas altitudes, o por disminución del intercambio de oxígeno en los capilares alveolares en los pulmones, como en la fibrosis pulmonar, enfisema, y enfermedad cardíaca crónica con una desviación de izquierda a derecha. La hipoxia tisular se produce también (1) por un defecto en el transporte de oxígeno eritrocitario como en la anemia severa, (2) cuando los ligandos de la hemoglobina, como la carboxihemoglobina, sulfohemoglobina, y metahemoglobina están presentes impidiendo la unión del oxígeno, (3) en hemoglobinopatías, (4) en concentraciones inapropiadas de 2,3-DPG eritrocitario, y (5) en deficiencias enzimáticas intraeritrocitarias. La hiperoxia terapéutica debe ser monitoreada cuidadosamente debido al peligro de toxicidad por el oxígeno. En recién nacidos esto puede causar fibroplasia retrolental y en adultos la enfermedad de membrana hialina de los pulmones (síndrome respiratorio adulto).

2,3-Difosfoglicerato

La interacción del DPG y la hemoglobina en hipoxia están relacionadas con el aumento de los niveles intraeritrocitarios de la desoxihemoglobina, la cual une grandes cantidades de

DPG. Esta unión resulta en un mecanismo de retroalimentación que estimula la glicólisis y la síntesis del DPG. El aumento de las concentraciones de desoxihemoglobina aumenta el pH, que a su vez también estimula la síntesis de DPG. Carrell y Lehman (1979) enfatizan que hay una relación recíproca entre las concentraciones de hemoglobina y de DPG. La deficiencia de la piruvato cinasa conduce a un incremento de DPG, afinidad disminuida por el oxígeno, y una concentración baja de hemoglobina. La deficiencia de hexocinasa conduce a una disminución del DPG y a una respuesta eritropoyética compensatoria con valores de hemoglobina aumentados. Muchas mutaciones de la hemoglobina resultan en una afinidad aumentada por el oxígeno por parte de la hemoglobina anormal, y algunas otras mutaciones aumentan esta afinidad aun más a través de una unión alterada al DPG, tales como HbS^{Shepherds Bush}, HbS^{Ohio}, HbS^{Little Rock}.

Otras hemoglobinas

La concentración de la HbF puede variar desde el 10% al 90%, y la distribución de la HbF en los glóbulos rojos, determinada por la técnica de Kleihauer, puede ser heterogénea. Los posibles patrones de distribución celular anormal son los siguientes:

- *Patrones celulares separados.* Los glóbulos rojos que contienen HbA o HbF se observan en casos de hemorragia materno fetal si la sangre de la madre es examinada o en caso de hemorragia materno fetal si la sangre del infante es examinada.
- *Distribución uniforme.* La HbA y HbF se encuentran igualmente distribuidas en todos los glóbulos rojos. Esta distribución se observa en la persistencia hereditaria de HbF (PHF).
- *Distribución irregular.* Los glóbulos rojos tienen cantidades variables de HbA y HbF. Este patrón se observa en la talasemia, enfermedad falciforme, anemia de Fanconi, y esferocitosis hereditaria.

La concentración de HbA₂ puede variar desde 1.4% a 20%, incluyendo valores bajos, normales, elevados, y muy altos. La concentración de la HbA₂ se encuentra aumentada en la α^0 -talasemia, hemoglobinemias inestables de cadena α , rasgo falciforme, anemias megaloblásticas, e hipertiroidismo. Se observan valores normales o bajos en β^0 -talasemias, $\alpha\beta$ -talasemias (heterocigotos Lepore), $\alpha\beta$ -talasemia, y persistencia hereditaria de la hemoglobina fetal. En la hemoglobina de homocigotos Lepore, la HbA₂ está ausente porque no hay síntesis de la cadena α . La HbA₂ está disminuida en desórdenes adquiridos tales como deficiencia férrica, anemias sideroblásticas y envenenamiento.

En las α -talasemias homocigotas, el valor A₂, aun cuando se encuentre bajo o normal en el paciente, será alto en ambos padres. Si el nivel de la HbA₂ en el paciente se expresa como un porcentaje de la hemoglobina total, ésta mantiene el rango mencionado previamente desde bajo a alto, pero si se expresa en relación al valor de HbA únicamente, la relación está disminuida en todos los casos de α -talasemia, es decir, la relación A/A₂ es de alrededor 10:1 al compararla con la relación normal A/A₂ de alrededor 40:1. Si el nivel de HbA₂ está demasiado aumentado, la HbF es normal o solamente apenas elevada y viceversa. En la α^0 -talasemia, hay una ausencia total de HbA, y por lo tanto la hemoglobina del paciente consiste únicamente de HbF y de HbA₂, mientras que en la α^+ -talasemia se encuentran cantidades disminuidas de HbA (5% a 20%). En estas α -talasemias, pueden observarse cadenas β exactamente en el punto de aplicación del electroforetograma a pH alcalino. La



reducción severa en las cadenas de α -globina conduce a una relación α/β menor que 0.25:0.3. Algunas de las hemoglobinopatías más comúnmente evaluadas por electroforesis en acetato de celulosa, pH 8.6, y agar con citratos, pH 6.0 a 6.2, están representadas en la pág. 733.

Otros hallazgos bioquímicos relacionados

Debido a los componentes hemolíticos de la anemia en la mayoría de las hemoglobinopatías, los niveles de bilirrubina no conjugada en suero se encuentran elevados, y la haptoglobina está disminuida o ausente. También están aumentadas las concentraciones en suero de la aspartato aminotransferasa, lactato deshidrogenasa, y eritropoyetina. El aumento de eritropoyetina es responsable del 20% al 30% del aumento en eritropoyetina medular y es una consecuencia de la anemia y de la alta afinidad por oxígeno de la HbF, la cual aumenta aún más la anoxia tisular. La participación del hígado (hemosiderosis por transfusión) puede ocasionar una tendencia al sangrado. Un examen ligero de la orina puede mostrar que el color marrón de los dipirroles es causado por hemólisis excesiva

Uso de los resultados del hemograma para diferenciar entre deficiencia de hierro y las talasemias

Existen varias fórmulas para diferenciar la deficiencia en hierro de las formas leves de talasemias. Una de tales fórmulas es la función discriminante (FD):

$$FD = (VCM - GR - (5 \times Hb) - 3.4) \quad \text{Ec.36-3}$$

donde VCM está expresado en fL, GR (glóbulos rojos) está en millones/mm³, y Hb está en g% (g/dL). El valor de 3.4 es una constante que varía con el instrumento. Un resultado positivo de FD sugiere una deficiencia en hierro, mientras que un resultado negativo sugiere una talasemia. EJEMPLO: Un paciente con VCM de 65 fL, Hb de 13 g/dL, y GR de 6 millones/mm³: $FD = 65 - 6 - (5 \times 13) - 3.4 = -9.4$. El ejemplo indica un diagnóstico de talasemia menor. Una fórmula más simple es la relación VCM/GR. Los valores de esta relación mayores que 13 están asociados con anemia deficiente en hierro; valores menores que 13 están asociados con talasemias. En el ejemplo de arriba la relación sería de 10.8.

Métodos de Análisis

Haptoglobina

Steven C. Kazmierczak

Principios de análisis y uso actual.

La haptoglobina es una glicoproteína de fase aguda que aumenta en sangre después de una enfermedad aguda o de un estado de choque. La proteína une la hemoglobina libre, facilitando la remoción de hemoglobina por el sistema reiticuloendotelial. De este modo la haptoglobina disminuye en la hemólisis intravascular como resultado de la unión con la hemoglobina y su remoción subsiguiente. Las bajas concentraciones de haptoglobina son generalmente indicadores de destrucción eritrocítica. Sin embargo, los individuos con inflamación y hemólisis simultáneas pueden mostrar concentraciones de haptoglobina baja, normal, o aun aumentada.

Los métodos de elección para la medición de concentraciones de haptoglobina son inmunológicos. Estos incluyen inmunonefelometría (Tabla 36-6, método 1) e inmunodifusión radial (IDR) (Tabla 36-6, método 2). Las técnicas inmunonefelométricas para la haptoglobina están basadas en la cantidad de luz dispersada que se produce cuando el contenido de haptoglobina en suero se mezcla con reactivos que contienen anticuerpos antihaptoglobina; la cantidad de luz dispersada es directamente proporcional a las concentraciones de haptoglobina en la muestra.[ref\(1466\)](#) También se ha descrito un método nefelométrico basado en la velocidad de formación del complejo de antígeno-anticuerpo.[ref\(1467\)](#) Los métodos inmunonefelométricos tienen las ventajas de requerir tamaños pequeños de muestra, realización rápida, y buena precisión. Las desventajas de la técnica incluyen costos altos de reactivos y necesidad de instrumentación especializada. Ver capítulo 12 para mayores discusiones sobre estas dos técnicas.

El método de IDR para haptoglobina sérica está basado en la medición de un anillo de precipitina que se forma a medida que difunde la haptoglobina del suero difusible en un gel delgado de dos dimensiones que contiene anticuerpo antihaptoglobina. La concentración de haptoglobina en la muestra es proporcional al diámetro del anillo de precipitina que se forma (ver también capítulo 11). La medición de los anillos de precipitina puede realizarse por dos métodos. En la primera técnica, la placa de IDR se incuba hasta que cese el crecimiento del anillo de precipitina y se alcanza el equilibrio.[ref\(1468\)](#) La concentración de haptoglobina se obtiene por comparación del diámetro del anillo con una curva estándar obtenida con suero de referencia. Desafortunadamente, este método requiere aproximadamente de 48 horas para que se desarrolle completamente el anillo de precipitina.

En un esfuerzo para obtener resultados más rápidamente, antes de que ocurra el desarrollo completo del anillo, puede utilizarse una técnica de no-equilibrio. En esta técnica los anillos de precipitina se miden antes de que alcancen su tamaño total y los resultados pueden obtenerse generalmente en 18 horas. Sin embargo, la precisión de la técnica de no equilibrio es mucho peor que el método de equilibrio.

La técnica de IDR tiene la ventaja de requerir tamaños de muestra pequeños, de fácil uso, costos mínimos en equipos, y precisión aceptable. La principal desventaja es el tiempo de incubación relativamente largo para el desarrollo de los anillos de precipitina.

Muestra.

El suero libre de hemólisis es la muestra de elección. El suero puede guardarse por varios días de 2° a 8° C. Si se requiere un tiempo de almacenamiento mayor, las muestras deberán ser congeladas a -20° C. Deben evitarse repetidos ciclos de congelación y descongelación para minimizar el riesgo de desnaturalización de la haptoglobina.

Intervalo de referencia.

El intervalo de referencia normal para la haptoglobina en adultos es de 600 a 2700 mg/L (7.0 a 31.8 (mol/L)). Las concentraciones de haptoglobina en recién nacidos van desde bajas hasta no detectables; sin embargo, las concentraciones en adultos generalmente se alcanzan a los 4 meses de vida. No se ha encontrado la haptoglobina la existencia de alguna diferencia relacionada al sexo.[ref\(1469\)](#)



Hemoglobina F

Steven C. Kazmierczak

Principios de análisis.

La cuantificación de la HbF puede realizarse por una variedad de métodos. Quizás el procedimiento más simple es la prueba de desnaturalización alcalina (Tabla 36-7, método 1). Este método está basado en la resistencia relativa de la HbF a la desnaturalización por un álcali. [refs\(1470\)](#) El hidróxido de sodio se agrega típicamente a la solución de prueba para convertir oxihemoglobina en hematina. Después de la adición del álcali, la sangre de los adultos, que contiene bajas concentraciones de HbF, cambia rápidamente de un color rosáceo (de la oxi-Hb) a un amarillo marrón (de la hematina alcalina). La HbA desnaturalizada puede precipitarse con sulfato de amonio y removerse por filtración. La medición de la hemoglobina no precipitada resistente al álcali, representa una estimación de la cantidad de HbF presente. Se han descrito varias modificaciones a este procedimiento para mejorar su exactitud. [ref\(1471\)](#)

Un método común en uso para la determinación de HbF es la separación electroforética de esta hemoglobina de otras fracciones de hemoglobina (Tabla 36-7, método 2)(ver la siguiente discusión sobre electroforesis de hemoglobina). Se puede medir la fracción separada de la HbF mediante el barrido del gel de electroforesis con un densitómetro. [ref\(1472\)](#) Desafortunadamente, la medición de HbF por este método es cuando mucho solamente semicuantitativo y adolece de falta de sensibilidad.

Se han descrito técnicas inmunológicas (Tabla 36-7, método 3) tales como el radioinmunoanálisis (RI), [ref\(1473\)](#) inmunodifusión radial (IDR), [ref\(1474\)](#) ensayo inmunoabsorbente unido a enzima (conocido más comúnmente como ELISA, sus siglas en inglés), [ref\(1475\)](#) y análisis inmunofluorométrico resuelto por tiempo (AIF). [ref\(1476\)](#) El uso de anticuerpos policlonales, o más recientemente, monoclonales dirigidos contra las subunidades de la cadena α de la HbF, permite cuantificar esta fracción de hemoglobina. Los métodos inmunológicos son generalmente muy exactos con un rango analítico relativamente grande. Además, los procedimientos ELISA e IFMA pueden realizarse relativamente rápido.

Se han desarrollado procedimientos cromatográficos como la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) con uso de columnas de intercambio catiónico (Tabla 36-7, método 4). Estos procedimientos permiten la separación de la HbF de las hemoglobinas normales y sus variantes. [ref\(1477\)](#) Los métodos por HPLC han sido implementados y son rápidos, técnicamente fáciles, y dan buena precisión y reproducibilidad. [ref\(1478\)](#)

Muestra.

Son muestras aceptables la sangre completa anticoagulada con la sal disódica del ácido etilenediaminetetracético (EDTA), heparina, o oxalato de amonio. La sangre completa puede guardarse por una semana a 4° C sin pérdida apreciable de HbF. El almacenamiento por un año a 4° C provoca una disminución de la HbF de aproximadamente el 10%. [ref\(1479\)](#)

Intervalo de referencia.

En los recién nacidos la HbF representa del 60% al 95% de la hemoglobina total presente. La proporción de HbF disminuye a menos del 10% alrededor de 28 semanas después del parto. Los adultos saludables contienen bajas concentraciones de HbF, alcanzando del 0.6% al 1.0%. Con el uso del RIA se ha obtenido el intervalo de referencia más largo que va



de 0 a 2.8% de HbF.[ref\(1480\)](#)

Separación y cuantificación de la hemoglobina

Gerardo Perrotta

Principios de análisis.

Los eritrocitos contienen diferentes especies de hemoglobina, cuya identificación puede ayudar en el diagnóstico de individuos con hemoglobinopatías. Generalmente se necesita una combinación de métodos, incluyendo procedimientos cualitativos y cuantitativos, para una identificación positiva de la presencia de hemoglobinas anormales.

La separación electroforética de hemoglobinas utiliza la diferencia de carga de la mayoría de las muestras de hemoglobina. Los diversos procedimientos electroforéticos pueden diferir en el pH, el tipo de buffer usado, el medio de soporte, o la fuerza del campo eléctrico. El método electroforético más usado para el fraccionamiento de la hemoglobina emplea un medio de soporte de acetato de celulosa con un buffer alcalino a pH 8.4 (Tabla 36-8, método 1). Esta técnica resuelve rápidamente la mayoría de las fracciones principales de la hemoglobina, como A₁, A₂, F y S. Sin embargo, esta técnica no puede resolver HbS de HbD y HbG, ya que estas tres fracciones tienen la misma movilidad con este procedimiento. De igual manera, las hemoglobinas C, E, y O tienen la misma movilidad que la HbA₂ (Fig. 36-8).

Muchos laboratorios también emplean la separación electroforética de las hemoglobinas a un pH ácido (6.0) en gel de agar como medio de soporte (Tabla 36-8, método 2). Cuando esta técnica es usada con el procedimiento de acetato de celulosa con buffer alcalino, puede lograrse la confirmación de la presencia de las hemoglobinas D, G, C, y E (Fig. 36-9).

Una vez realizada la separación de la hemoglobina se debe determinar la posición y la intensidad relativa de la fracción de hemoglobina. Esto puede llevarse a cabo por fijación (desnaturalización) de las fracciones de hemoglobina seguidas por la visualización de la proteína hemoglobina con una tinción específica. Típicamente para visualizar las fracciones separadas, se usan colorantes como Paragon Blue, Ponceau S, o Negro Amida 10. La intensidad de coloración relativa de cada fracción es cuantificada con el uso de un densitómetro.

Además de la determinación electroforética de las hemoglobinas, se utilizan diversos métodos no electroforéticos para cuantificar las fracciones de hemoglobina específicas S, A₂, o F. Estos métodos se basan en las diferencias en solubilidad, carga, o estabilidad en soluciones alcalinas que presentan las diversas fracciones de hemoglobina.

El procedimiento para la HbS se basa en la solubilidad de esta hemoglobina (Tabla 36-8, método 3). La desoxihemoglobina S es menos soluble que la desoxi-HbA₁, y los glóbulos rojos tratados que contienen niveles elevados de HbS adoptan una apariencia falciforme. Las hemoglobinas, incluyendo la HbS, en una muestra son tratadas con agentes reductores, tales como ditionito o metabisulfito de sodio en una solución de buffer de fosfatos. La prueba de solubilidad, o falciformismo, puede dar resultados erróneos si la concentración de HbS es menor de aproximadamente 25%.[ref\(1481\)](#) Además, una alta concentración de HbF puede inhibir la capacidad de estos agentes reductores para inducir el falciformismo. Esta



prueba también ha resultado ser poco confiable en individuos con baja concentración de hemoglobina en sangre (esto es, ≤ 2 g/dL) o con policitemia. Los fármacos como las fenotiazinas en altas concentraciones (>128 (g/mL) pueden también inhibir el falciformismo o revertir el falciformismo inducido por metabisulfito de sodio.[ref\(1482\)](#)

La cuantificación de la HbA₂ se realiza mejor por cromatografía en columna (Tabla 36-7, método 4). Esta técnica está basada en diferencias de carga de varias fracciones de hemoglobina y en su afinidad para la adsorción en una columna de intercambio iónico que contenga dietilaminoetil celulosa. Bajo las condiciones empleadas en el procedimiento, la HbA₂ no es adsorbida en la columna y es la primera fracción que eluye de la columna. La elución de la fracción o fracciones de hemoglobina remanentes se logra por el uso de amortiguadores de fuerza iónica creciente. El porcentaje de Hb presente en los eluados está determinado por la medición de la absorbancia de los eluados a 415 nm. La medida de la HbA₂ por cromatografía en columna es simple, segura, y precisa.[ref\(1483\)](#) Sin embargo, la cuantificación de HbA₂ por cromatografía en la presencia de HbS, HbC, o de algunas otras variantes puede conducir a errores. Es posible una cuantificación exacta de la HbA₂ por densitometría después de la separación electroforética si se presta una atención cuidadosa a la técnica y si los instrumentos usados son calibrados correctamente.[ref\(1484\)](#)

La rápida identificación de la HbF es la que se realiza más frecuentemente utilizando los métodos de desnaturalización por álcali. La hemoglobina fetal es más resistente a la desnaturalización por álcali fuerte que lo que son las otras hemoglobinas. El agregado de un álcali fuerte, tal como KOH o NaOH, a un hemolisado causa la desnaturalización de otras hemoglobinas, excepto de la HbF. Después de la desnaturalización, se agrega una solución de sulfato de amonio para precipitar las hemoglobinas desnaturalizadas, y la centrifugación remueve la hemoglobina desnaturalizada. La cantidad de hemoglobina remanente en el sobrenadante es medida espectrofotométricamente a 415 nm y se expresa como la hemoglobina fetal resistente al álcali.

Muestra.

El tipo de muestra requerido, sangre total o hemolisado, es dependiente del tipo de procedimiento utilizado. Para la separación electroforética de las hemoglobinas, la cromatografía en columna, y la desnaturalización alcalina, se requiere toda la sangre que ha sido preparada como un hemolisado. Se colecta la sangre completa en EDTA, heparina, u otro anticoagulante apropiado. Después de la centrifugación de la muestra, se descarta el plasma de las células extraídas. Puede prepararse el hemolisado por lisis de las células con un reactivo hemolisante como saponina o mezclando una alícuota de la sangre completa con agua destilada. Los especímenes de sangre total (no hemolisada) para electroforesis son estables por más de 2 semanas si son guardadas a 4° C; la sangre total para la determinación de la HbA₂ por cromatografía por columna es estable por 1 semana a 4° C. La muestra que se requiere para la determinación de HbS por solubilidad, corresponde a la sangre total anticoagulada.

Intervalo de referencia

Los eritrocitos de adultos saludables normales contienen HbA₁, HbA₂, y HbF. La HbA₂ constituye por lo general aproximadamente del 1.5% al 3.5% de la hemoglobina total adulta, mientras que la HbF generalmente constituye menos del 1% de la hemoglobina adulta

normal. El remanente está compuesto por HbA₁. En ciertas hemoglobinopatías, los porcentajes relativos de cada fracción pueden aumentar o disminuir. Existen varios textos y una revisión reciente disponibles que ofrecen una visión más integral de los valores esperados, que se observan en pacientes con desórdenes de hemoglobina.[refs\(1485\)](#)

Agradecimientos

Los editores desean agradecer al autor de la versión previa de los métodos de la haptoglobina y de la hemoglobina F, Robert S. Franco.

Referencias

1. Bunn HF, Forget BG: *Hemoglobin: molecular, genetic and clinical aspects*, Philadelphia, 1986, Saunders.
2. Summers RN, Yerlley JC, Hyland VJ, et al: Mapping the human a-globin gene complex to 16p13.2 → pter, *J Med Genet* 4:761, 1987.
3. Shaeffer JR: Evidence for a difference in affinities of human hemoglobin b^A and b^S chains for a chains, *J Biol Chem* 255:2322, 1980.
4. Urbanetti JS: Carbon monoxide poisoning. In Wallach DFH, editor: *The function of the red blood cells: erythrocyte pathobiology*, New York, 1981, Alan R Liss.
5. Schumacher HR: Methemoglobinemia, sulfhemoglobinemia, and carboxy-hemoglobinemia. In Schumacher HR, Garvin DF, Triplett DA, editors, *Introduction to laboratory hematology and hematopathology*, New York, 1984, Alan R Liss.
6. Zijlstra WG, Buursma A, Meewisen van der Roest WP: Absorption of human fetal and adult oxyhemoglobin, deoxyhemoglobin, carboxyhemoglobin, and methemoglobin, *Clin Chem* 37:1633, 1991.
7. Carrell RW, Winterbourn CC, Rachmilewitz EA: Recommended methods for surface counting to determine sites of red cell destruction, *Br J Haematol* 30:250, 1975.
8. Finch CA: Methemoglobinemia and sulfhemoglobinemia, *N Engl J Med* 239:470, 1948.
9. Weatherall DJ, Clegg JB: *The thalassemia syndrome*, Oxford, England, 1981, Blackwell Scientific Publications.
10. Fairbanks VF: Nomenclature and taxonomy of hemoglobin variants. In Fairbanks VF, editor: *Hemoglobinopathies and thalassemias*, New York, 1980, Brian C Decker, Publisher.
11. Westhall DJ: Abnormal hemoglobins and thalassemias. In Hoffbrand AV, Brain MC, Hirsh J, editors: *Recent advances in hematology*, London, 1977, Churchill Livingstone.
12. Lubin BH, Witkowska HE, Kleman K: Laboratory diagnosis of hemoglobinopathies, *Clin Biochem* 24:363-374, 1991.
13. Buihl RW: Physical chemical properties of sickle cell hemoglobin. In Wallach DPH, editor: *The function of red blood cells: erythrocyte pathobiology*, New York, 1981, Alan R. Liss.
14. Ranney HM: The spectrum of sickle cell disease, *Hosp Pract* (off Ed) 27: pp 133-137, 141-144, 149-150 passim, Jan 15, 1992.
15. Bunn HF: Hemoglobin II, sickle cell anemia and other hemoglobinopathies. In Beck WS, editor: *Hematology*, Cambridge, Mass., 1981, MIT Press.
16. Nagel RL, Bookchin RM: Oxygen transport and the sickle cell. In Wallach DFH, editor: *The function of red blood cells: erythrocyte pathobiology*, New York, 1981, Alan R. Liss.
17. Kark JA, Posey DM, Schumacher HR, et al: Sickle cell trait as a risk factor for sudden death in basic training, *N Engl J Med* 317:781, 1987.



18. Charache S: Fetal hemoglobin, sickling and sickle cell disease, *Adv Pediatr* 37:1, 1990.
19. Testa V, Dubait A, Hinard N, et al: Beta⁰-thalassemia/HbE association, *Acta Haematol* 64:42, 1980.
20. Ohba Y: Unstable hemoglobins, *Hemoglobin* 14:353, 1990.
21. Kreimer-Birnbaum M, Pinkerton PH, Bannerman RM, et al: Dipyrrolic urinary pigments in congenital Heinz-body anemia due to Hb Koln and in thalassemia, *Br J Med* 2:396, 1966.
22. Fairbanks VF: Thalassemias and hereditary persistence of fetal hemoglobins (HPFH). In Fairbanks VF, editor: *Hemoglobinopathies and thalassemias, laboratory methods and case studies*, New York, 1980, Brian C Decker, Publisher.
23. Okene-Frempong K, Schwartz E: Clinical features of thalassemia, *Pediatr Clin North Am* 27:403, 1980.
24. Charache S, Clegg JB, Weatherall DJ: The Negro variety of hereditary persistence of fetal haemoglobin in a mild form of thalassemia, *Br J Haematol* 34:527, 1976.
25. Weatherall DJ, Clegg JB: Hereditary persistence of fetal haemoglobin, *Br J Haematol* 29:191, 1975.
26. Jaffe ER: Methemoglobinemia, *Clin Hematol* 10:99, 1981, specific p 103.
27. Jaffe ER: Methemoglobinemia, *Clin Hematol* 10:99, 1981, specific p 117.
28. Dover GJ, Boyer SH, Zinkhorn WH: Production of erythrocytes that contain fetal hemoglobin in anemia, *J Clin Invest* 63:173, 1979.
29. Hardisty RM, Speed DE, Till M: Granulocytic leukemia in childhood, *Br J Haematol* 10:551, 1964.
30. Weatherall DJ, Pembrey ME, Pritchard J: Fetal hemoglobin, *Clin Hematol* 3:467, 1974.
31. Bunn HF, Haney DN, Kain S, et al: The biosynthesis of human hemoglobin A_{1c}, *J Clin Invest* 57:1652, 1976.
32. Landau SA, Winchell HS: Endogenous production of ¹⁴CO: a method for calculation of RBC life-span in vivo, *Blood* 36:642, 1970.
33. Astrup P: Carbon monoxide inhalation-time for clearance from blood in reversible coma, *JAMA* 230:1064, 1974.
34. Smith JR, Landau SA: Smoker's polycythemia, *N Engl J Med* 298:6, 1978.
35. van Lente F, Marchand A, Galen RS: Evaluation of a nephelometric assay for haptoglobin and its clinical usefulness, *Clin Chem* 25:2007, 1979.
36. Sternberg JC: A rate nephelometer for measuring specific proteins by immunoprecipitin reactions, *Clin Chem* 23:1456, 1977.
37. Mancini G, Carbonara AO, Heremans JF: Immunochemical quantitations of antigens by single radial immunodiffusion, *Immunochemistry* 2:235-254, 1965.
38. Fahey JL, McKelvey EM: Quantitative determinations of serum immunoglobulins in antibody-agar plates, *J Immunol* 94:84-90, 1965.
39. Schrijver J, van Rijn H, Schreurs W: Re-evaluation of the haptoglobin reference values with the radial immunodiffusion technique, *Clin Biochem* 17:258, 1984.
40. Wood WG, Stamatoyannopoulos G, Lim G, Nute PE: F-cells in the adult: normal values and levels in individuals with hereditary and acquired elevations of HbF, *Blood* 46:671-682, 1975.
41. Apt L, Downey WS Jr: "Melena" neonatorum: the swallowed blood syndrome, *J Pediatr* 47:6-12, 1955.
42. Liu N, Wu AB, Wong SS: Improved quantitative Apt test for detecting fetal hemoglobin in bloody stools of newborns, *Clin Chem* 39:2326-2329, 1993.
43. Garver FA, Jones CS, Baker MM, et al: Specific radioimmunochemical identification and quantitation of hemoglobins A₂ and F, *Am J Hematol* 1:459-469, 1976.
44. Chudwin DS, Rucknagel DL: Immunological quantification of hemoglobins F and A₂, *Clin Chim Acta* 50:413-418, 1974.
45. Makler MT, Pesce AJ: ELISA assay for measurement of human hemoglobin A and hemoglobin F, *Am J Clin Pathol* 74:673-676, 1980.
46. Turpeinen U, Stenman U-H: Determination of fetal hemoglobin by time-resolved immunofluorometric assay, *Clin Chem* 38:2013-2018, 1992.



47. Brunnekreeft JW, Eidhof HH: Improved rapid procedure for simultaneous determinations of hemoglobins A1a, A1b, A1c, F, C, and S, with indication for acetylation or carbamylation by cation-exchange liquid chromatography, *Clin Chem* 39:2514-2518, 1993.
48. Tan GB, Aw TC, Dunstan RA, Lee SH: Evaluation of high performance liquid chromatography for routine estimation of hemoglobins A₂ and F, *J Clin Pathol* 46:852-856, 1993.
49. Garver FA, Jones CS, Baker MM, et al: Specific radiochemical identification and quantitation of hemoglobins A₂ and F, *Am J Hematol* 1:459-469, 1976.
50. Nalbandian RM, Nichols BM, Camp FR Jr, et al: Dithionite tube test, a rapid inexpensive technique for the detection of hemoglobins S and non-S sickling hemoglobin, *Clin Chem* 17:1028-1032, 1971.
51. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Standard for abnormal hemoglobin detection by cellulose acetate electrophoresis, NCCLS Tentative Standard: TSH-8, Villanova, Penn., 1980, NCCLS.
52. Gottfried EI, Wall B, Robertson NA: Reliable estimation of hemoglobin A₂ concentration by electrophoresis with densitometry, *Am J Clin Pathol* 72:415-420, 1979.
53. Huntsman RG: Sickling tests, microscopic and non-microscopic. In Schmidt RM, Husman THJ, Lehmann H, et al, editors: *The detection of hemoglobinopathies*, Cleveland, 1988, CRC Press.
54. McFadzean JA: The effect of phenothiazines on the sickling phenomenon in vitro, *Br J Haematol* 16:173, 1969.
55. Sonnenwirth AC, Jarett L: *Gradwohl's clinical laboratory methods and diagnosis*, ed 8, vol 1, St. Louis, 1980, Mosby.
56. Miale JB: *Laboratory medicine hematology*, ed 5, St. Louis, 1982, Mosby.
57. Lubin BH, Witkowska HE, Kleman K: Laboratory diagnosis of hemoglobinopathies, *Clin Biochem* 24:363-374, 1991 (review).

Bibliografia

- Bick RL, Bennett JM, Brynes RK, et al: *Hematology: clinical and laboratory practice*, St. Louis, 1993, Mosby.
- Bunn HF, Forget BG: *Hemoglobin: molecular, genetic and clinical aspects*, Philadelphia, 1986, Saunders.
- Hoffbrand AV, Brenner MK: *Recent advances in haematology*, London, 1992, Churchill Livingstone.
- Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, et al: *Hematology: basic principles and practice*, New York, London, 1991, Churchill Livingstone.
- Jandl JH: *Blood: textbook of hematology*, Boston, 1987, Little, Brown & Co.
- Lee GR, Bithell TC, Foerster J, et al: *Wintrobe's clinical hematology*, ed 9, Philadelphia, 1993, Lea & Febiger.
- Rappaport SI: *Introduction to hematology*, ed 2, Philadelphia, 1987.
- Schumacher HR: *Introduction to laboratory hematology and hematopathology*, New York, 1984, Alan R. Liss.
- Stamatoyannopoulos G, Nieuhaus AW, Leder P, Majerus PW: *The molecular basis of blood diseases*, ed 2, Philadelphia, 1994, Saunders.
- Weatherall DJ, Clegg JB: *The thalassemia syndrome*, Oxford, 1981, Blackwell Scientific Publications.
- Williams WJ, Beutler E, Eislev E, Lichtman MA: *Hematology*, ed 4, New York, 1990, McGraw-Hill.

Tablas

Tabla 36-1 Hemoglobinas humanas normales

Designación	Estructura tetramérica	Hemolisado (%)	
		Adulto	Recién nacido
Adulto			
HbA	$\alpha_2\beta_2$	95-98	20-30
HbA2	$\alpha_2\delta_2$	2-3	0.2
Fetal		<1	80
HbF	$\alpha_2\gamma_2$		
Embrionaria			
Gower 1	$\xi_2\varepsilon_2$	0	0
Gower 2	$\alpha_2\varepsilon_2$	0	0
Hb Portland	$\xi_2\gamma_2$	0	0

Tabla 36-2. Manifestaciones clínicas asociadas con algunas hemoglobinas anormales

Desórden	Hb anormal	Cambio estructural	Comentarios
Anemia hemolítica	H	alfa2beta2 → beta4	Hemoglobina inestable que ocurre en algunas formas de alfa-talasemias; la precipitación de hemoglobina y hemolisis son aceleradas por ciertas drogas
	S	beta 6glu → val	Forma agregados moleculares cuando es desoxigenada, produciendo anemia falciforme en homocigotos
	C	beta 6 glu → lys	Baja solubilidad disminuye la plasticidad de los glóbulos rojos, causando anemia hemolítica en homocigotos
	DPunjab	beta 121 glu → gln	Mecanismo desconocido
	E	beta 26 glu → lys	
	Zurich	beta 63 his → arg	Hemoglobina inestable precipitada por ciertos fármacos, produciendo anemia hemolítica en heterocigotos

	Köln	beta 98 val → met	
	Sydney	beta 67 val → ala	
	Santa Ana	beta 88 leu → pro	La hemoglobina inestable causa anemia hemolítica no esferocítica congénita en heterocigotos;
	Philly	beta 35 tyr → phe	la hemoglobina
	Gun Hill	deleción beta de 5 residuos entre 90 y 96	precipitada tiende formar cuerpos de inclusión con los glóbulos rojos, bajo ciertas condiciones
Cianosis debida a metahemoglobinemia	MBoston	alfa 58 his → tyr	Metahemoglobinemia causa cianosis en heterocigotos; hay evidencia de anemia hemolítica
	MIwate	alfa 87 his → tyr	
	MHyde Park	beta 92 his → tyr	
Cianosis causada por aumento de desoxihemoglobina	Kansas	beta 102 asn → thr	La afinidad disminuída de la hemoglobina por el oxígeno causa cianosis en heterocigotos
Policitemia	ICapetown	alfa 92 arg → gln	La afinidad aumentada de la hemoglobina por el oxígeno dificulta la liberación del oxígeno a los tejidos, causando policitemia compensatoria en heterocigotos
	Chesapeake	alfa 92 arg → leu	
	Rainier	beta 145 try → cys	
Hidropos fetales	Bart's	Alfa2gamma2 → gamma2	Hemoglobina inestable con alta afinidad por el oxígeno que ocurre en alta concentración en fetos nacidos muertos con alfa-talasemias de homocigotos

De: Schmidt RM, Brosius, EM: *Basic laboratory methods of hemoglobinopathy detection*, Atlanta, 1978, Centers for Disease Control.

Tabla 36-3. Variación de la severidad clínica en los diferentes síndromes falciformes clínicos.

Genotipo	% de hemoglobina S	% de hemoglobina no-S	Severidad clínica
SA	30-40	60-70 (A)	0
SF*	70	30 (F)	0
SS	80-90	5-15 (F)	++/++++
S-talasemia	80	20 (A + F)	+ /+++
SC	50	50 (C)	+ /+++
SO.SD	30 - 40	60 - 70	++/++++



De: Bunn HF; Anemia falciforme y otras hemoglobinopatías. En Beck WS, editor: *Hematology*, Cambridge, Mass., 1981, MIT Press.

* Estado doble heterocigoto para la hemoglobina S y persistencia hereditaria de la hemoglobina fetal.

Tabla 36-4. Hallazgos de laboratorio en α -talasemias

Genotipo	Anemia (hipocrómica)	Tipos de Hb	Delección de la cadena- α
α -talasemia rasgo 1	\pm	Nacimiento: Hb Bart's 5%- 10% HbCS 1%-2% Adulto: HbA, A2, F	2
α -talasemia 1/a-talasemia 1 (hidropos)	+++	Nacimiento: Hb Bart's 80%. Trazas de HbH y Portland Adulto: No es compatible con la vida	4
α -talasemia 2/rasgo	\pm	Nacimiento: Hb Bart's 1%-2% HbCS 1%-2% Adulto: HbA, A2, F	1
α -talasemia 1/ α -talasemia 2 (enfermedad HbH)	\pm (inclusiones)	Nacimiento: Hb Bart's 1%- 15% HbH 4%-30% Adulto: HbA, A2, F HBH 8%-10%	3
α -talasemia 1/HbCS (Hb H/CS)	++ (inclusiones)	Nacimiento: Hb Bart's, HbH, HbCS Adulto: HbH, HbA, A2, F, CS	2 más mutación en la terminación de la cadena- α
α -talasemia 2/HbCS	+	Nacimiento: Hb Bart's Adulto: HbA, CS	1 más mutación en la terminación de la cadena- α
HbCs/HbCS	+	Nacimiento: Hb Bart's Adulto: HbA, A2, F, CS	Mutación en la terminación de la cadena- α

Tabla 36-5. Intervalos de referencia para la hemoglobina en gramos por litro en individuos blancos y negros "aparentemente saludables."

Individuos	Significado (intervalo de referencia)
Hombre adulto	151 (139-163)
Mujer adulta	135 (120-150)

Niños		
Nacimiento		200 (185-215)
1 mes		170 (155-185)
3 meses		150 (135-165)
6 meses		140 (130-160)
9 meses		130 (120-140)
1 año		121 (100-140)
2 años		123 (105-142)
4 años		126 (112-143)
8 años		134 (120-148)
14 años		140 (125-150)
Niñas		
Nacimiento		195 (180-210)
1 mes		170 (158-189)
3 mese		148 (133-164)
6 meses		138 (128-148)
9 meses		128 (117-139)
1 año		122 (100-140)
2 años		122 (105-142)
4 años		127 (113-142)
8 años		130 (115-145)
14 años		132 (116-148)
De: Miale JB: <i>Laboratory medicine: hematology</i> , ed 6, St. Louis, 1982, Mosby.		

Tabla 36-6. Métodos de medidas de haptoglobina

Método	Principio	Uso	Comentarios
1. Nefelometría	La reacción de la haptoglobina con anticuerpos antihaptoglobina resulta en la formación de complejos antígeno-anticuerpo que dispersan la luz	Método en uso más común	Preciso, automático; requiere instrumentación especializada
2. Inmunodifusión radial (RID)	La difusión del suero que contiene haptoglobina en gel con anticuerpos antihaptoglobina resulta en la formación de anillos de precipitación. El diámetro o área del anillo está directamente relacionado con las concentraciones de haptoglobina	Usado frecuentemente	No automatizado; menos preciso que la nefelometría



Tabla 36-7. Métodos de análisis de la hemoglobina F

Método	Principio	Uso	Comentarios
1. Desnaturalización alcalina	Excepto para la HbF, las hemoglobinas son desnaturalizadas por agregado de álcali (NaOH). Las hemoglobinas desnaturalizadas pueden ser precipitadas con sulfato de amonio.	Comunmente usado	No es exacto a bajas concentraciones de HbF
2. Electroforesis	Las hemoglobinas son separadas por electroforesis y cuantificadas por barrido densitofotométrico	Frecuentemente usado	El método muestra pobre correlación con el método de desnaturalización por álcali.
3. Inmunológico (RIA; RID, ELISA, IFMA)	La HbF reacciona con un anticuerpo específico dirigido contra las subunidades de las cadenas γ . El método de detección es dependiente del método específico utilizado.	Comunmente usado	Exacto y reproducible
4. HPLC	Las hemoglobinas se separan de acuerdo a la carga iónica neta y a la distribución de carga a un pH particular.	No se usa Frecuentemente	Los sistemas disponibles comercialmente pueden permitir un uso más común de este método

Tabla 36-8. Métodos de análisis de hemoglobina

Método	Principio	Uso	Comentario
1. Electroforesis (alcalina)	Separación electroforética de fracciones de hemoglobina en soporte de acetato de celulosa a pH 8.4 A ₂ S F A ₁ (-) C D (+) E G O Lepore	El más frecuentemente usado	Simple, rápido Requiere equipo especializado

2. Electroforesis (ácida)	Separación electroforética de fracciones de hemoglobina en gel de agarosa a pH 6.0	Usada para confirmación del seguimiento de resultados de la electroforesis alcalina de hemoglobina	Simple, rápido Requiere equipo especializado
	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;"> F (-) </div> <div style="text-align: center;"> A1 E D G Lepore </div> <div style="text-align: center;"> S (+) </div> <div style="text-align: center;"> C </div> </div>		
3. Solubilidad (prueba de falciformismo)	La HbS es reducida con ditionita o metabisulfito causando que la hemoglobina se desnaturalice. La hemoglobina desnaturalizada produce un aumento en la turbidez de la solution	Se usa a menudo como prueba exploratoria para HbS	Sujeto a interferencias (ver texto)

Figuras

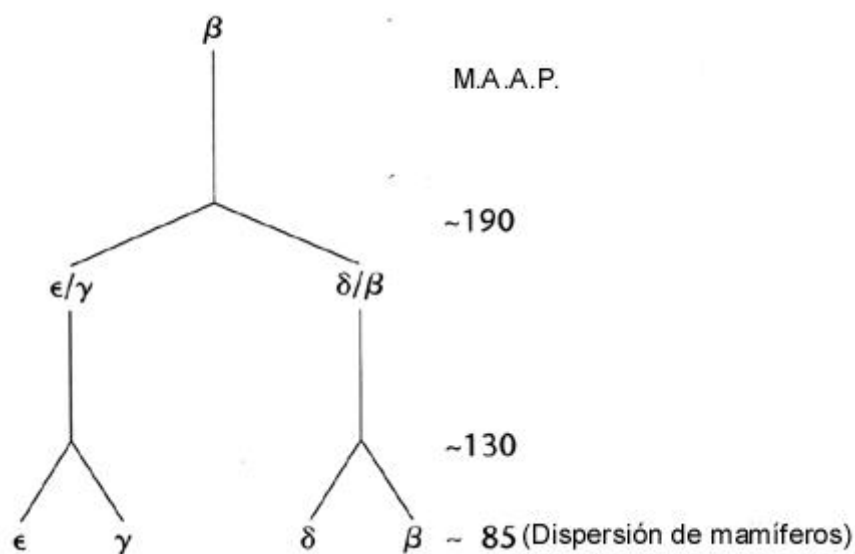


Figura 36-1 La historia evolutiva del gen de globina. M.A.A.P. = un millón de años antes del presente. (De: Steinberg MH, Adams JG III: Hemoglobin A₂: origin, evolution and aftermath, *Blood* 78:2165, 1991.)

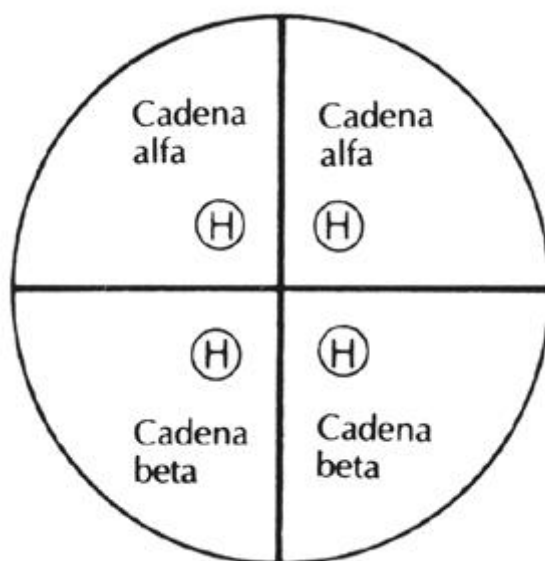


Figura 36-2 Diagrama de la estructura de la molécula de HbA. Los cuatro grupos hemo están unidos a una molécula de globina, que consiste de cuatro cadenas polipeptídicas, dos de las cuales tienen una secuencia idéntica de aminoácidos de un tipo (cadena α) y las otras dos tienen una secuencia idéntica de aminoácidos de otro tipo (cadena β). Cada cadena polipeptídica está conjugada con un grupo hemo. H, Hemo. (De: Bauer JD: *Clinical laboratory methods*, ed 9, St. Louis, 1982, Mosby.)

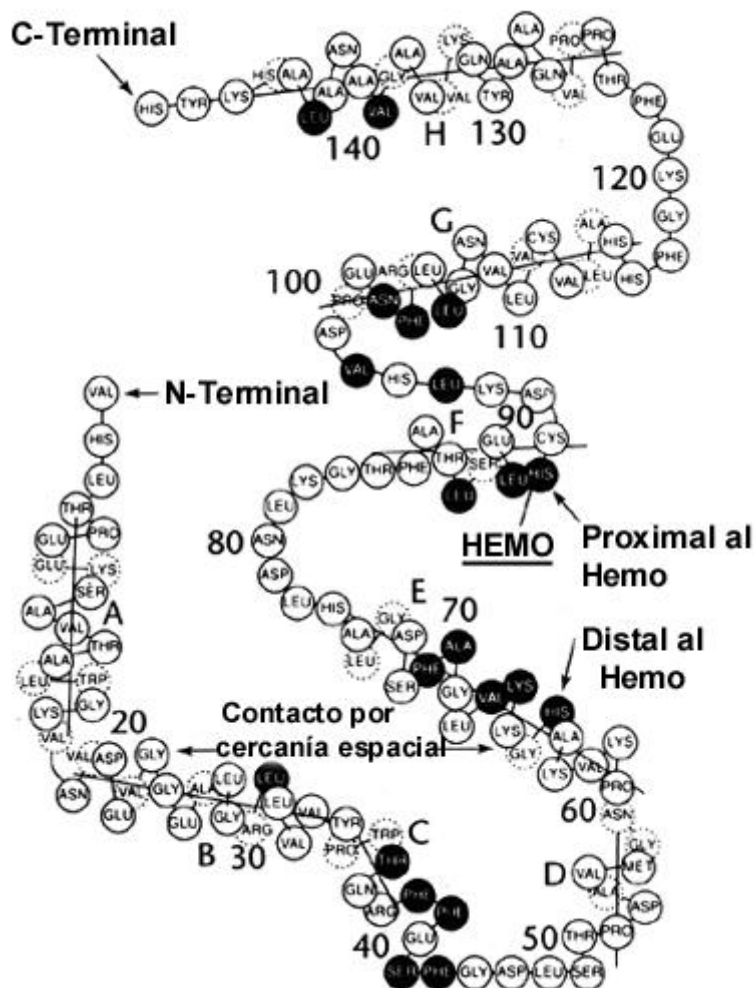


Figura 36-3 La cadena α de globina mostrando los segmentos helicoidales y no helicoidales. Los segmentos helicoidales están marcados desde A hasta H, mientras que los segmentos no helicoidales son designados NA para aquellos residuos ubicados entre el N terminal y la hélice A, CD para los residuos localizados entre las hélices C y D, etc. (De Huisman THJ, Schroeder WA: *New aspects of the structure, function and synthesis of hemoglobin*, Boca Raton, Fla., 1971, CRC Press.)

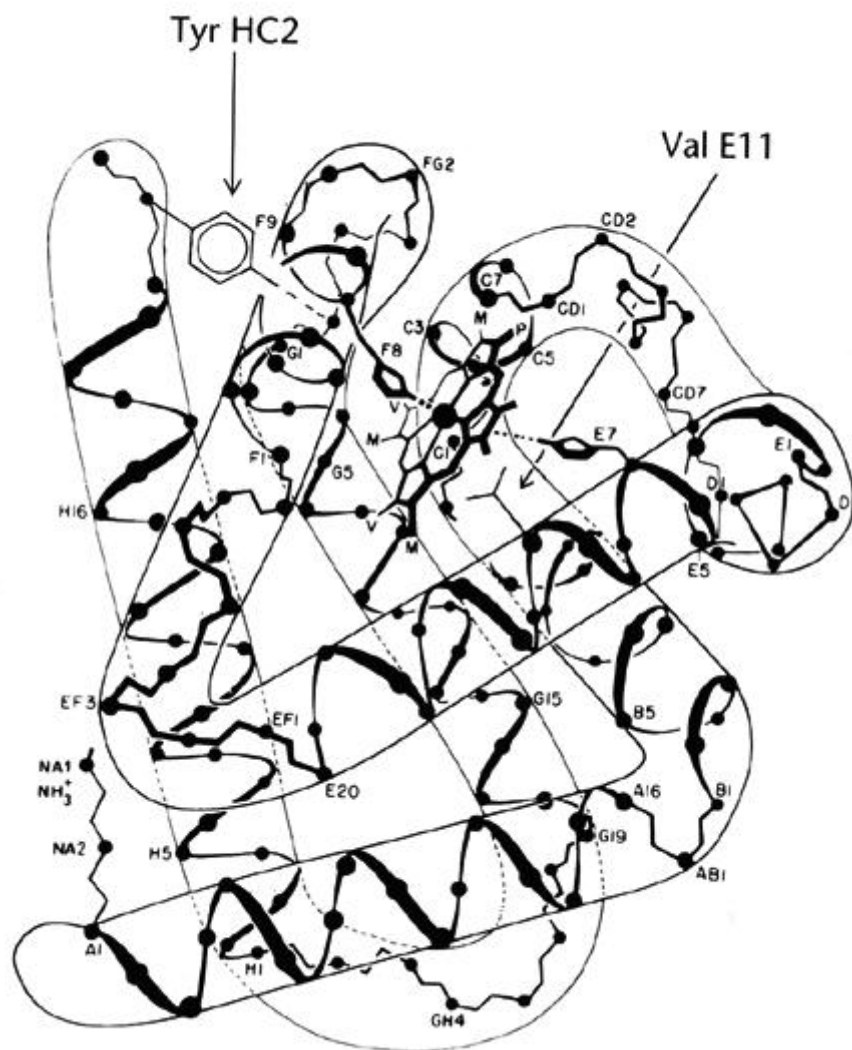


Figura 36-4 Estructura primaria y secundaria de las hemoglobinas que muestra los carbonos α y la coordinación de los hemos. El diagrama muestra la histidina proximal F8 unida al grupo hemo, los residuos distales His E7 y Val E11, y también Tyr HC₂, los cuales son importantes en el mecanismo de las hemoglobinas de mamíferos. El número exacto de residuos en los diferentes segmentos son iguales en todos los mamíferos pero varían en otros vertebrados. Las letras M, V y P denotan las cadenas laterales metil, vinil y propionato del hemo. (De Perutz MF: Molecular, anatomy, physiology and pathology of hemoglobin. In *The molecular basis of blood disease*, Philadelphia, 1987, Saunders.)

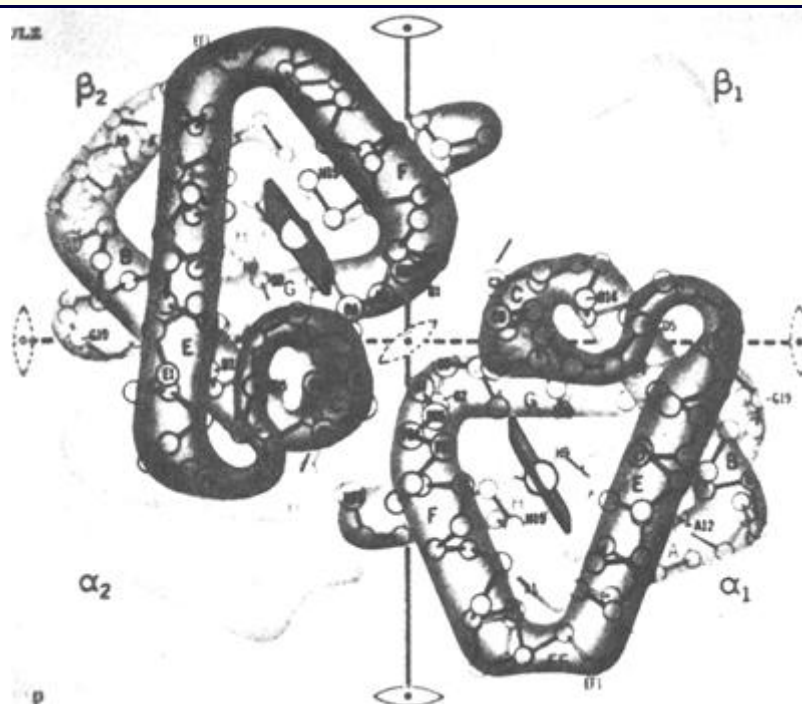


Figura 36-5 Estructura cuaternaria de la hemoglobina. Las cadenas α_1 y α_2 se encuentran enfrente una de la otra, y el contacto entre $\alpha_1\beta_2$ está en el centro. (De Dickerson RE, Geis I: *The structure and action of proteins*, Menlo Park, Calif., 1969, Benjamin/Cummings.)

Hemoglobinas (embrionicas)	Hemoglobinas (% al nacer)	Hemoglobinas (% en adultos)
Gower 1 $\zeta_2\epsilon_2$	HbF $\alpha_2\gamma_2$ (75)	HbA $\alpha_2\beta_2$ (97)
Portland 1 $\zeta_2\gamma_2$	HbA $\alpha_2\beta_2$ (25)	HbA ₂ $\alpha_2\delta_2$ (2.5)
Gower 2 $\alpha_2\epsilon_2$		HbF $\alpha_2\gamma_2$ (<1)

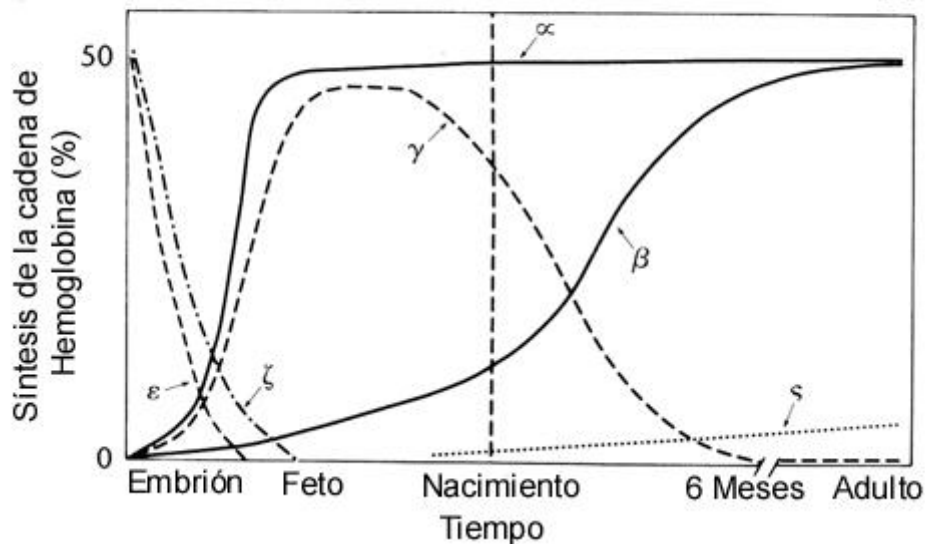


Figura 36-6 Cambios de globina durante el desarrollo embrionario, fetal y adulto. Los genes ζ y ϵ se transcriben durante el desarrollo embrionario y pronto son reemplazados por el gen fetal γ -globina y el gen adulto β -globina. Al nacimiento, la hemoglobina fetal y la hemoglobina A forman el 75% el 25% del total, respectivamente. La transcripción del gen γ empieza a declinar antes del nacimiento y alrededor de los seis meses de edad este gen se expresa a niveles muy bajos. Las expresiones del gen δ de globina empiezan alrededor el nacimiento. En adultos, la hemoglobina A representa alrededor del 97%, la hemoglobina A₂ alrededor del 2.5%, y la hemoglobina fetal alrededor de 1% del total. (De Steinberg MH: Hemoglobinopathies and thalassemias. In Stein JH, editor: *Internal medicine*, ed 3, Boston, 1990, Little Brown & Co.)

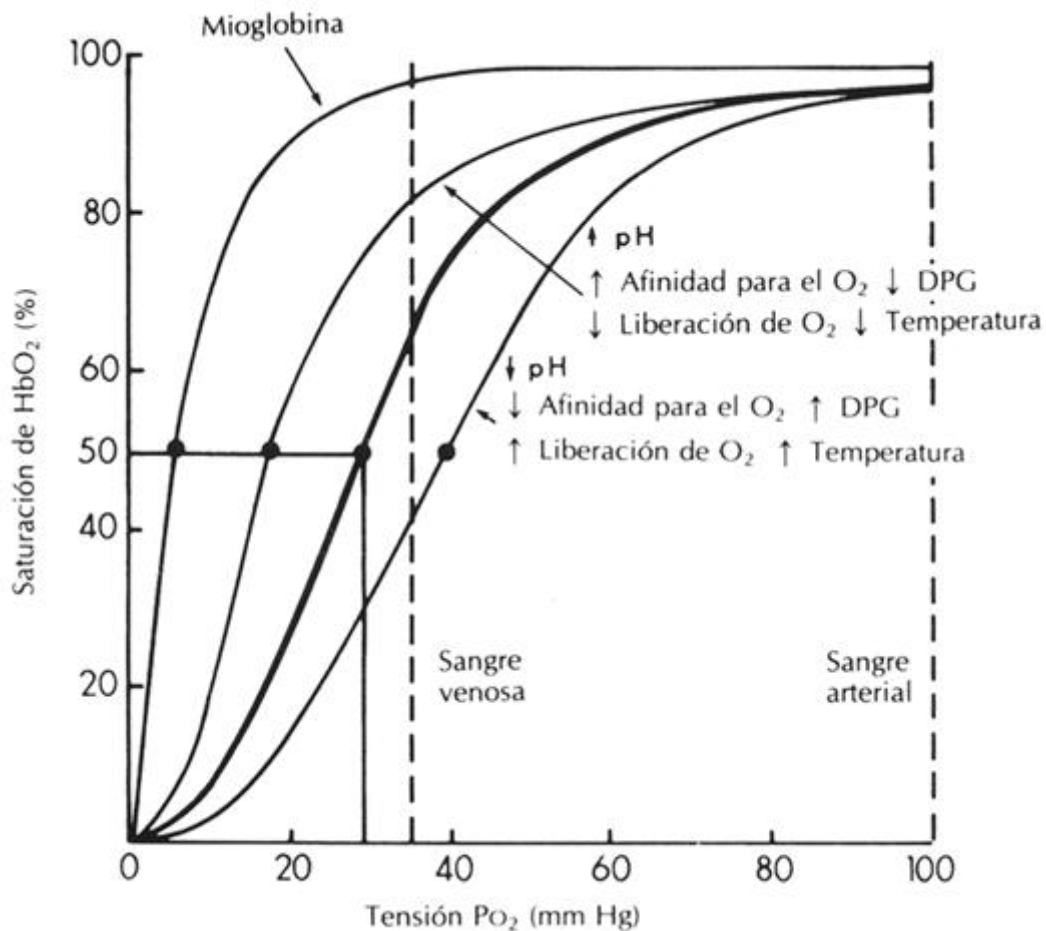


Figura 36-7 Curvas de disociación de oxígeno de la hemoglobina normal humana. Línea gruesa intermedia, curva de disociación de sangre de adulto normal (Temperatura 37 °C, pH 7.4, P_{CO_2} 35 mm Hg). Puntos, valores de P_{50} , presión parcial de oxígeno (27 mm Hg) en la que una solución de hemoglobina es 50% oxihemoglobina y 50% desoxihemoglobina. Si la temperatura aumenta, el pH disminuye o la tensión de dióxido de carbono (P_{CO_2}) aumenta, la curva se desplaza a la derecha. Este desplazamiento incrementa la liberación de oxígeno de la hemoglobina a una tensión de oxígeno dada a través de disminuir la afinidad de oxígeno. Si la temperatura disminuye, el pH se eleva o la tensión de dióxido de carbono disminuye, la curva de disociación de oxígeno se mueve a la izquierda. Este desplazamiento incrementa la capacidad de la unión de oxígeno a la hemoglobina a una tensión de oxígeno dada: por lo tanto ocurre una disminución en la liberación de oxígeno. (De Bauer JD: *Clinical laboratory methods*, ed 9, St. Louis, 1982, Mosby.)



Celulosa/acetatos pH 8.4

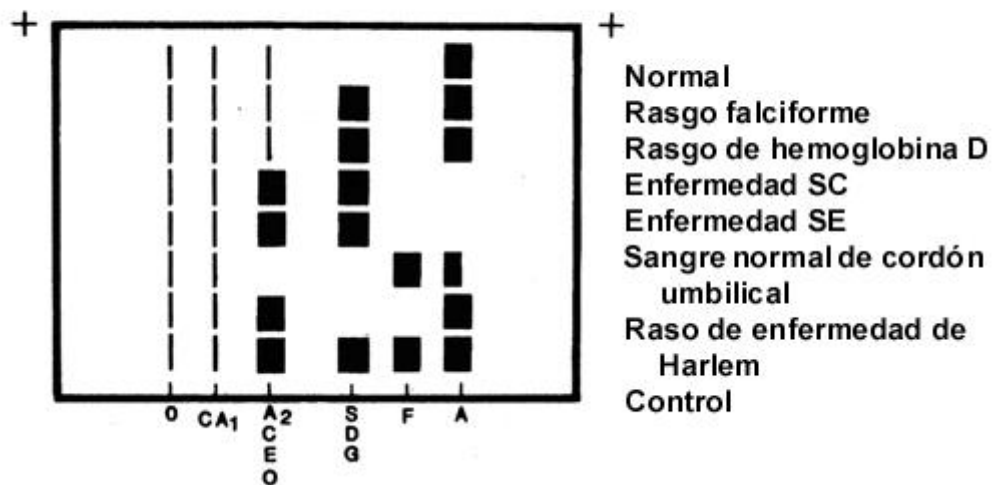


Figura 36-8 Representación de la electroforesis de hemoglobina en tiras de acetato de celulosa, pH 8.4. CA₁, Anhidrasa carbónica; el resto son variantes de hemoglobina discutidas en el texto. (De CDC77-8266; Atlanta, 1976, DHEW.)

Agar/citratos pH 6.0- 6.2

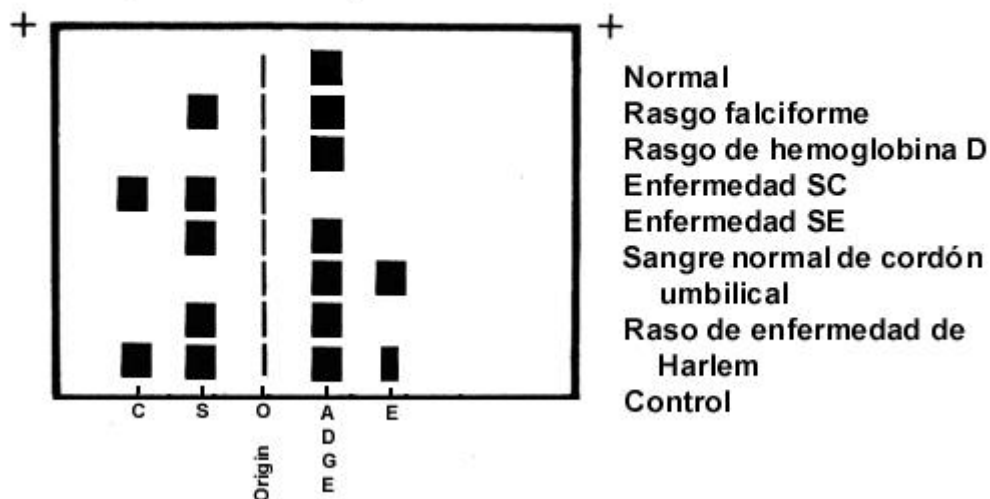




Figura 36-9 Representación de la electroforesis de hemoglobina en agar con citrato, pH 6. En algunas placas el origen puede no ser tan visible o tan separado de HbS como se muestra aquí. (De CDC77-8266; Atlanta, 1976, DHEW.)

CAPÍTULO 37

37. Nutrición Humana

Nancy W. Alcock

Clases de nutrientes

- Requerimientos energéticos
- Hidratos de carbono
- Proteínas
- Lípidos
- Macroelementos
- Fibra

Nutrición en la salud y en la enfermedad

- Población general
- Interacciones fármaco-nutriente
- Población hospitalizada

Apoyo terapéutico nutricional

- Alimentación enteral
- Nutrición parenteral

Nutrición y errores congénitos del metabolismo

Parámetros bioquímicos utilizados para monitorear el estado nutricional

- Monitoreo general
- Síndrome de realimentación
- Balance nitrogenado
- Síntesis proteica

OBJETIVOS

- ♦ Discutir la contribución de las clases individuales de nutrientes al metabolismo humano.
- ♦ Discutir la importancia de la nutrición en la salud y en la enfermedad.
- ♦ Discutir el apoyo terapéutico nutricional por las vías enteral y parenteral.



- ♦ Discutir el rol del laboratorio en el apoyo a los programas de malnutrición y a los pacientes con errores congénitos de metabolismo.
- ♦ Enumerar los parámetros bioquímicos usados para monitorear el estado nutricional.

Términos Clave

alimentación enteral Suministro de nutrientes sintéticos al tracto gastrointestinal a través de un tubo.

anabolismo Procesos bioquímicos que sintetizan macromoléculas como las proteínas y los ácidos nucleicos.

balance nitrogenado Diferencia entre la ingesta total de nitrógeno y la suma de las excreciones urinaria y fecal. Es una estimación de la síntesis neta de proteínas corporales.

biodisponibilidad Cantidad (normalmente expresada como porcentaje) de componentes de la dieta capaces de ser absorbidos en el tracto gastrointestinal, ya sea intactos o después de ser degradados.

catabolismo Procesos metabólicos que degradan o escinden macromoléculas.

consumo energético en reposo (CER) Energía consumida en estado de reposo, es decir en un estado metabólico basal.

dieta Alimento que es ingerido oralmente.

disfagia Dificultad para tragar.

kilocaloría (Kcal) Cantidad de energía producida por un alimento que equivale a la energía requerida para elevar la temperatura de 1 Kg de agua desde 15° C hasta 16° C.

kilojoule (Kj) Unidad de calor; 1 Kj equivale a aproximadamente 0.24 Kcal.

kwashiorkor Malnutrición causada por una dieta deficiente en proteínas.

malnutrición Nutrición subóptima provocada por una ingesta, biodisponibilidad o utilización de nutrientes inadecuada o desequilibrada.

marasmo Malnutrición proteica-calórica provocada por una ingesta inadecuada de alimentos como resultado de ayuno parcial o completo.

metabolismo basal (MB) Energía necesaria para mantener las funciones fisiológicas básicas.

nutriente Componente de la dieta utilizado por el cuerpo en algún camino metabólico.

nutrición Ciencia que estudia los procesos de requerimiento, ingesta, biodisponibilidad, absorción, utilización y excreción de nutrientes.

nutrición parenteral Nutrientes administrados por una vía distinta al tracto gastrointestinal.

nutrición parenteral periférica (NPP) Nutrición parenteral introducida a través de una vena periférica.

nutrición parenteral total (NPT) Nutrición parenteral como única fuente de nutrición.



nutrientes esenciales Nutrientes requeridos para el crecimiento y desarrollo normales y para mantener el cuerpo adulto en equilibrio, que no pueden ser sintetizados totalmente o en las cantidades requeridas. Son las vitaminas, minerales, oligoelementos, ciertos aminoácidos y por lo menos un ácido graso.

Ración Recomendada en la Dieta (RRD) Requerimientos diarios sugeridos de algunos nutrientes esenciales para individuos sanos de varias edades, publicados por el Comité de Alimentos y Nutrición del Consejo Nacional de Investigaciones. (Food and Nutrition Board of the National Research Council).

La ciencia de la nutrición trata sobre aspectos cualitativos y cuantitativos de la dieta y la utilización de los componentes dietarios requeridos para mantener la salud. Los principales nutrientes requeridos para la nutrición humana-hidratos de carbono, proteínas, lípidos, minerales, oligoelementos, vitaminas y fibra-están bioquímicamente bien definidos. Algunos nutrientes pueden ser sintetizados por procesos metabólicos, pero otros no, de manera que deben ser aportados específicamente por la dieta. Estos nutrientes son denominados *esenciales* e incluyen los aminoácidos y los ácidos grasos esenciales (ver más adelante). Todas las vitaminas hidrosolubles y las vitaminas liposolubles A, E, y K son esenciales. La vitamina D, cuarta vitamina liposoluble, es requerida para el crecimiento de los niños, pero en los adultos se produce en cantidades adecuadas a partir de su precursor endógeno, el 7-dehidrocolesterol. La grasa dietaria y su absorción son prerequisites para la absorción de las vitaminas liposolubles (ver Capítulo 30).

La variación en el requerimiento de nutrientes depende de la edad y sexo de los individuos, su estado reproductivo, y de la alteración de las demandas nutricionales por enfermedades, lesiones o intervenciones terapéuticas. El Comité de Alimentos y Nutrición de la Comisión de Ciencias Biológicas del Consejo Nacional de Investigaciones estima los niveles de nutrientes esenciales en la dieta que deberían ser adecuados para cumplir con las necesidades de nutrientes conocidos de prácticamente todas las personas sanas. Estas estimaciones se informan como Ración Recomendada en la Dieta (RRD) y se revisan periódicamente. La última revisión fue publicada en 1989.[ref\(1486\)](#)

Diferentes estimaciones indican que por lo menos el 40% de los pacientes hospitalizados están mal nutridos. La Comisión Conjunta para la Acreditación de Organizaciones de Cuidado de la Salud (conocido por su acrónimo en inglés, JCAHO) ha subrayado la importancia de un plan nutricional que tenga por objeto la detección de la malnutrición, el monitoreo de la ingesta nutritiva del paciente y la ruta que siguen los nutrientes. Los objetivos y medios para alcanzar dichos objetivos deben ser definidos para los pacientes bajo riesgo nutricional. Aunque las mediciones antropométricas son los primeros indicadores de una nutrición subóptima, la evaluación nutricional mediante parámetros bioquímicos puede alertar al médico sobre ciertas deficiencias. Los análisis bioquímicos son muy importantes para el monitoreo de las respuestas de los pacientes a la suplementación nutricional.

Los aspectos bioquímicos y clínicos de los nutrientes esenciales y su función se discuten en detalle en los capítulos correspondientes (ver Tabla 37-1). Las referencias 2 y 3 proveen detalles adicionales. La discusión en este capítulo se limita a los objetivos enunciados al comienzo.



Tipos de Nutrientes

Requerimientos energéticos^{refs(1487)}

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define así el requerimiento energético de un individuo: “El nivel de ingesta de energía que equilibrará el gasto energético cuando el individuo tiene un tamaño, una composición corporal y un nivel de actividad física consistentes con buena salud a largo plazo.

El requerimiento de energía debería permitir también el mantenimiento de una actividad física económicamente necesaria y socialmente deseable. En niños y mujeres embarazadas o en período de lactancia, el requerimiento de energía comprende las necesidades energéticas asociadas con la formación de tejidos o la secreción de leche a velocidades consistentes con la buena salud”.^{ref(1488)}

El cuerpo está en equilibrio energético cuando la ingesta de energía metabolizable es igual a la suma del consumo de energía y los cambios en la energía almacenada. El gasto de energía puede ser determinado por calorimetría directa (calor generado), calorimetría indirecta (medición del consumo de oxígeno y producción de anhídrido carbónico) y por dilución isotópica usando agua doblemente marcada. El consumo de energía endógena almacenada puede ser cuantificado por medición del balance de nitrógeno. Para el crecimiento del feto, placenta y otros cambios asociados al embarazo y a la lactancia, es esencial un balance de nitrógeno positivo. Durante los períodos de crecimiento y los estados de estrés patológico se requiere energía adicional. Las hormonas y citoquinas, como el factor de necrosis tumoral, pueden iniciar una respuesta metabólica importante a las lesiones e infecciones. El incremento del metabolismo asociado con el estrés fisiológico se denomina *estado hipermetabólico*.

Los pacientes que sufren de trauma o sepsis a menudo están en estado hipermetabólico. La aceleración del metabolismo, que es proporcional a la severidad del trastorno, resulta en pérdida de sensibilidad a la insulina e hiperglucemia. Además, los triglicéridos almacenados son movilizados y oxidados y, si el paciente no es alimentado, pueden ser agotados los depósitos de grasas y de proteínas. La pérdida de tejido adiposo (grasa) y de tejido muscular (proteína) provoca que los individuos que sufren malnutrición proteica y calórica tengan apariencia de consumidos. En estos casos, al principio debe brindarse un apoyo nutricional mínimo que luego se incrementará gradualmente para mantener la masa celular. Los parámetros bioquímicos útiles para el monitoreo de los pacientes serán discutidos más adelante. El uso de glutamina, un nutriente intestinal específico, en enfermos críticos ha sido beneficioso para la producción renal de amoníaco, que es un precursor de la síntesis de nucleótidos y por lo tanto un regulador de la síntesis de proteínas.

Al nacimiento, la necesidad de energía es de aproximadamente 120 Kcal/Kg/día, tanto para hombres como para mujeres. Durante los primeros 2 años de vida hay una caída gradual a 90-100 Kcal/Kg/día. Desde 2 hasta 14 años de edad los requerimientos de energía disminuyen gradualmente hasta aproximadamente 40 Kcal/Kg/día, requiriendo los hombres 5 Kcal/Kg/día más que las mujeres.

Hidratos de Carbono

Los hidratos de carbono son la fuente principal de energía para el organismo, contribuyendo con 50% a 60% de las calorías totales.^{ref(1489)} Los carbohidratos complejos

como los almidones y los azúcares que se encuentran en frutas y hortalizas son una mejor fuente de energía que los azúcares simples y pueden disminuir la incidencia de la hipertensión, la diabetes de la edad madura y las enfermedades cardiovasculares. Un consumo excesivo de hidratos de carbono lleva a un aumento del peso corporal, mientras que un consumo insuficiente estimula la movilización de los depósitos, lo que resulta en cetosis, pérdida de electrolitos y deshidratación. En un adulto sano, los hidratos de carbono son almacenados como glucógeno, principalmente en el músculo (alrededor de 150 g) y en el hígado (alrededor de 90 g). Un gramo de hidratos de carbono aporta 4 Kcal de energía.

Proteínas

Requerimientos.

Las proteínas de la dieta son la fuente de aminoácidos, que son los “bloques de construcción” para la síntesis y mantenimiento de las proteínas tisulares.^{ref(1490)} Algunos aminoácidos no pueden ser sintetizados en absoluto o en las cantidades necesarias para satisfacer los requerimientos, y por lo tanto son “esenciales” en la dieta. Los aminoácidos esenciales se muestran en el cuadro siguiente:

Aminoácidos esenciales		
Isoleucina	Fenilalanina	Histidina*
Leucina	Treonina	Arginina*
Lisina	Triptofano	Taurina ^H
Metionina	Valina	
<p>* Innecesario para el mantenimiento del balance nitrogenado según estudios a corto plazo en adultos, pero probablemente necesario para el crecimiento normal en niños.</p> <p>^H Requerido en niños.</p>		

La calidad de las proteínas de la dieta se determina a partir de su contenido en aminoácidos esenciales. Para bebés y niños de hasta 10 años de edad, para niños de 10 a 12 años, y para adultos la ingesta de aminoácidos debería incluir 43%, 36%, y 10% de aminoácidos esenciales, respectivamente. Se requiere proteína de buena calidad cuando es necesario reemplazar pérdidas durante la fase aguda del estrés fisiológico asociado a la fiebre, quemaduras, trauma quirúrgico, fracturas y otros estados patológicos. Por otro lado, para el tratamiento de las fallas hepáticas agudas y la uremia es necesaria la restricción proteica.

Balance nitrogenado.

Los estudios de balance de nitrógeno se usan para evaluar la utilización de aminoácidos de la dieta para la síntesis de proteínas y el balance entre los procesos anabólicos y catabólicos. Para calcular la ingesta de nitrógeno proteico se realiza un registro exacto de la dieta. La evaluación de la excreción de nitrógeno requiere la medición del nitrógeno fecal y del nitrógeno urinario y una corrección por pérdidas de nitrógeno a través del sudor, pelo, uñas y células desprendidas de la piel. La evaluación cuantitativa más exacta de la excreción

de nitrógeno mide la excreción total de nitrógeno, lo que puede ser logrado usando instrumentos que miden directamente los compuestos nitrogenados totales en la orina o en las heces por quimoluminiscencia luego de la pirólisis de la muestra. Debido a que esta técnica no es ampliamente usada, a partir de la medición del nitrógeno uréico de la orina (NUO) puede obtenerse una estimación de la excreción de nitrógeno. El NUO debe ajustarse por un factor que da cuenta de las otras pérdidas corporales. En un adulto, un balance nitrogenado positivo se asocia en general con buena salud. Durante los períodos de crecimiento y desarrollo y durante el embarazo, un balance nitrogenado positivo es obligatorio. Durante los períodos de ayuno, caquexia y muchas enfermedades hipermetabólicas un balance nitrogenado negativo debería alertar al médico para considerar un apoyo nutricional apropiado. Durante el estado más catabólico de una enfermedad aguda la frecuencia de las mediciones cuantitativas estará dictada por la respuesta del paciente a la terapia, pero se recomiendan varias evaluaciones semanales. [ref\(1491\)](#)

Los estados de deficiencia proteica como la enfermedad de *kwashiorkor* ocurren en los países subdesarrollados cuando los lactantes alimentados con leche materna son transferidos a una dieta rica en hidratos de carbono. El *kwashiorkor* a menudo es fatal y se caracteriza por edema, diarrea, erupciones y lesiones cutáneas.

En el marasmo hay una deficiencia nutricional general y aparece en niños con signos clásicos de hambre, como la pérdida de tejido adiposo y muscular, lo que produce una apariencia de persona consumida o extenuada. Hay superposición entre las condiciones del marasmo y del *kwashiorkor*, y a menudo no se distingue entre ambas. Sin embargo, los individuos con marasmo no tienen edema severo y normalmente retienen su alerta mental.

La Ración Recomendada en la Dieta (RRD) para proteínas, para diferentes edades y condiciones, se muestra en la Tabla 37-2. Un gramo de proteína aporta 4 Kcal de energía.

Lípidos

Los lípidos son los macronutrientes más densos en energía, aportando 9 Kcal/g de grasa. [ref\(1492\)](#) Aunque la dieta de un estadounidense típico contiene 35% a 45% de calorías como grasa, la Asociación Americana de Cardiología (A.H.A.) y el Comité de Alimentos y Nutrición de la Comisión Nacional de Investigaciones recomiendan que el consumo de grasas sea reducido al 30% de las calorías totales.

En vista de la asociación de las grasas saturadas de origen animal con las enfermedades del corazón, se recomienda que por lo menos el 10% de la grasa ingerida sea poli-insaturada. Algunos ácidos grasos que se encuentran en los lípidos estructurales de las células y en las membranas mitocondriales no pueden ser sintetizados en cantidad suficiente, por lo que su suplementación es esencial. Los ácidos grasos esenciales son el linoléico, el linolénico y el araquidónico, aunque todavía se discute si el linolénico es realmente esencial. El ácido araquidónico da cuenta del 5% a 10% de los ácidos grasos en los fosfolípidos de la membrana celular. Para la salud normal se requieren aproximadamente 2,7 g/día de ácidos grasos esenciales. Los lípidos son almacenados como triglicéridos, fundamentalmente en el tejido adiposo. El metabolismo lipídico y las enfermedades asociadas se discuten en el capítulo 33.

Macrominerales



La Ración Recomendada en la Dieta para los principales componentes inorgánicos de la dieta, los macrominerales, se muestran en la Tabla 37-3. El rol de cada uno de ellos se discute en detalle en los capítulos correspondientes, enumerados en la Tabla 37-1.

En la Tabla 37-4 se muestran aspectos importantes de los roles biológicos y síntomas de la deficiencia o exceso de diferentes minerales.^{ref(1493)} En el capítulo 38 se discute el papel biológico de los oligoelementos.

Fibra

La fibra es un componente importante de la dieta. Comprende los componentes de las células vegetales que no pueden ser digeridos por las enzimas intestinales. Las fibras más insolubles como la celulosa y la lignina del afrecho de trigo son beneficiosas para el funcionamiento del colon, mientras que las gomas y las pectinas de frutas y hortalizas, más solubles, han sido asociadas al descenso del nivel de colesterol en sangre.^{ref(1494)} Las dietas ricas en fibra se asocian con una menor incidencia de cáncer de colon, enfermedades cardiovasculares y diabetes mellitus.^{ref(1495)} Sin embargo, las dietas ricas en fibra por su contenido en fitato proporcionan sitios de unión para metales divalentes como calcio, hierro y zinc, disminuyendo la biodisponibilidad de estos metales. Por lo tanto, debe haber una mayor ingesta de estos metales cuando se consumen dietas ricas en fibra.

Nutrición en la Salud y en la Enfermedad^{ref(1496)} ***Poblaciones Generales***

Un énfasis incrementado en el bienestar ha llevado a sugerir mejoras en la composición de la dieta de los habitantes de Estados Unidos, para mantener una buena salud y prolongar la vida. Las recomendaciones de la Asociación Americana de Cardiología para disminuir el consumo total de grasas fueron descriptas en la sección anterior. Se recomienda aumentar el consumo de frutas y hortalizas, especialmente frutas cítricas y hortalizas anaranjadas, debido a que estos alimentos son ricos en vitaminas. Ha sido demostrado que la reducción en la ingesta de calorías es beneficiosa. Una ingesta calórica excesiva lleva a la obesidad y a los problemas de salud que la acompañan. Las poblaciones que requieren una consideración especial en cuanto a sus requerimientos nutricionales se describen en la Tabla 37-5. Es importante tener en cuenta que muchas de esas poblaciones incluyen individuos ambulatorios que no son enfermos agudos e incluso pueden estar totalmente sanos (como las mujeres embarazadas).

Los regímenes para individuos con hiperlipidemias o enfermedades cardíacas están restringidos en calorías, grasas totales, grasas saturadas y proteínas animales, y son ricos en hidratos de carbono complejos, fibra, proteínas vegetales y con una mayor proporción de grasas poli-insaturadas y mono-insaturadas. Los ácidos grasos omega-3 son efectivos para disminuir el nivel de triglicéridos plasmáticos.^{ref(1497)} El consumo de colesterol debería ser menor de 100 mg/1000 Kcal.

Los planes nutricionales para diabéticos con riesgo de desarrollar aterosclerosis recomiendan que por lo menos 55% a 60% de las calorías sean aportadas por hidratos de carbono.^{ref(1498)} Los carbohidratos complejos deberían aportar por lo menos dos tercios del total. La ingesta de proteínas debería proveer 12% a 16%, y las grasas deberían reducirse a 20% a 25% de las calorías totales, no más del 10% de las cuales deberían ser aportadas por



grasas saturadas. Un alto consumo de fibra (30 a 50 g/día) normalmente es beneficioso y bien tolerado.

Interacciones fármaco-nutriente

Roe^{ref(1499)} trata con detalle la naturaleza de las interacciones entre fármacos y nutrientes y sus consecuencias. Las interacciones fisicoquímicas pueden ocurrir en el tracto gastrointestinal y dificultar la absorción de fármacos y/o nutrientes. Los factores que influyen en este proceso son: solubilidad, pH del medio, capacidad de adsorción, quelación, formación de gel e intercambio iónico. Las interacciones fisiológicas en las que la función gastrointestinal está alterada pueden modificar el tiempo de tránsito y de ahí el grado de absorción, producir desequilibrio electrolítico o vasodilatación, o modificar el apetito de manera que la ingesta de alimentos resulte excesiva o inadecuada. Una tercera categoría de interacción ocurre cuando debido a la toxicidad de un fármaco se producen cambios patológicos que perturban el tracto gastrointestinal u otros órganos (como hígado, riñón, cerebro, sistema circulatorio o feto) y resultan en un efecto pronunciado sobre el metabolismo general. Roe enumera 59 fármacos cuya absorción puede ser reducida o retardada por alimentos o suplementos alimentarios, y 24 fármacos cuya absorción puede ser incrementada por alimentos o fórmulas enterales. Aunque los efectos de la composición de la dieta sobre el metabolismo y la toxicidad de fármacos han sido extensamente documentados en experimentos con animales, muy pocos estudios han sido realizados con humanos. Como ya fue señalado por Roe, ésta es un área en la que se requiere investigación, especialmente en las poblaciones de mayor edad, donde la alta prevalencia de reacciones a los fármacos combinada con la frecuencia de prescripciones múltiples puede implicar una explicación relacionada a la dieta.

Las dietas pobres en proteínas reducen el flujo plasmático renal, la depuración de creatinina y la depuración renal de ciertos fármacos como el anti-uricémico alopurinol, que inhibe la enzima xantina oxidasa.

Los fármacos básicos como la gentamicina son afectadas por el efecto alcalinizante de las dietas pobres en proteínas, presentando al riñón una forma menos ionizada del fármaco, lo que resulta en una reabsorción incrementada. Un área que requiere más estudio es el efecto de la obesidad sobre la distribución de los fármacos: ¿los fármacos lipofílicos deben ser prescritas de acuerdo al peso corporal ideal o al peso corporal de cada individuo?

Es conocido que las anfetaminas disminuyen el apetito. De la misma manera, la digitalis administrada en altas dosis por tiempo prolongado causa náuseas y caquexia. Muchos quimioterápicos para el tratamiento del cáncer también disminuyen el apetito; en algunos casos esto puede atribuirse a ulceración gastrointestinal.

El mecanismo de acción de muchos fármacos parece ser el de antagonista de una vitamina. Aunque los estudios in vitro y experiencias en animales aportan evidencia de este hecho, aún no está confirmado por estudios in vivo en humanos. La Tabla 37-6 enumera algunos fármacos que son antagonistas de vitaminas.

El efecto de fármacos sobre la retención o pérdida de los principales minerales en humanos está bien establecido y se resume en la Tabla 37-7.

Poblaciones Hospitalizadas



La malnutrición en las instituciones para el cuidado de enfermos crónicos y agudos puede ser un problema muy importante.^{ref(1500)} Alrededor del 40% de los pacientes hospitalizados que muestran signos de malnutrición comprende individuos que ingresan al hospital con condiciones crónicas preexistentes (como el síndrome de inmunodeficiencia adquirida, SIDA o cáncer) o aquellos enfermos agudos a causa de su hospitalización (como traumatismos, cirugía, quemaduras y bebés nacidos con bajo peso). Los individuos internados en instituciones para el cuidado de problemas crónicos como la vejez, no se alimentan adecuadamente y adquieren malnutrición crónica.

Los pacientes cancerosos con caquexia o que han sido sometidos a cirugías o terapias por radiaciones que interfieren con la función gastrointestinal se beneficiarán con el apoyo nutricional.^{ref(1501)} Una pérdida de peso progresiva antes de la cirugía es una indicación de la necesidad de un apoyo nutricional previo a la operación quirúrgica.

En todos estos casos será necesaria una intervención nutricional para tratar al paciente mal nutrido. La terapia nutricional debe ser adaptada a las necesidades de cada paciente. En todos los casos, la vía de administración dependerá de la capacidad funcional del intestino.

Apoyo Terapéutico Nutricional^{ref(1502)}

Alimentación enteral

La alimentación enteral es la introducción de nutrientes en el tracto gastrointestinal a través de un tubo.^{ref(1503)} Este método es necesario cuando los pacientes son incapaces de ingerir suficiente alimento en forma normal.

En la Tabla 37-8 se muestra una breve lista de las condiciones en que la alimentación enteral puede estar indicada. La disponibilidad de muchas fórmulas enterales comerciales "a medida" para cumplir distintos requerimientos ha significado una importante vía práctica para mantener una nutrición adecuada. La gastrectomía percutánea endoscópica y la yeyunoscopía han simplificado los procedimientos usados para guiar la colocación de los tubos. La ubicación de los tubos se determina según cada problema particular. Cuando hay aspiración repetida el tubo no debe ser colocado en el estómago sino en el yeyuno. Algunas de las indicaciones para nutrición enteral son los pacientes quemados que requieren un gran apoyo nutricional, estados de coma, obstrucción parcial del estómago o intestino grueso, fístulas del intestino grueso o del colon, anorexia persistente y trastornos con requerimientos específicos que deben ser satisfechos por la introducción de soluciones "a medida". En la referencia 17^{ref(1504)} hay una discusión más detallada sobre alimentación enteral. Cuando sea posible, la alimentación enteral se prefiere a la nutrición parenteral total (NPT) ya que permite al paciente mantener su intestino funcional, lo que contribuye a los procesos metabólicos normales. Además, las fórmulas enterales son más simples de manipular y preferibles a la administración intravenosa (nutrición parenteral). Cuando la alimentación enteral no es posible, los nutrientes deben ser administrados intravenosamente.

Nutrición parenteral (NP)^{ref(1505)}

El objeto de la nutrición parenteral es mantener o mejorar el estado nutricional de los pacientes que no pueden obtener los nutrientes necesarios a partir de la alimentación normal o de fórmulas enterales. Las soluciones parenterales de nutrientes se administran

intravenosamente por venas periféricas (nutrición parenteral periférica, NPP) o a través de una vena central a la que se accede por intermedio de un catéter (NPT). Periféricamente se pueden administrar emulsiones isotónicas de lípidos en glucosa 5% o 10%, aminoácidos al 5%, electrolitos y micronutrientes en formulaciones que aportan hasta 2500 Kcal en 3 litros. [ref\(1506\)](#) Cuando un enfermo crítico es inestable se requiere acceso continuo a una vena, por lo que es esencial un catéter central. La nutrición parenteral total permite que sean administrados mayores volúmenes y por lo tanto más nutrientes que por la vía NPP.

La Tabla 37-9 resume las condiciones en las que los pacientes pueden beneficiarse con la NPT.

El apoyo nutricional por NPT ha demostrado ser ventajoso para pacientes que reciben quimioterapia en los que la caquexia es un problema. Sin embargo, aunque la NPT usada preoperatoriamente en pacientes con tumores gastrointestinales mejora el resultado postoperatorio, no hay evidencia que la NPT mejore la tolerancia al tratamiento o el resultado en pacientes que reciben quimioterapia. La evidencia de un efecto beneficioso de la NPT administrada preoperatoriamente a pacientes malnutridos es equívoca. Ha sido demostrado que el apoyo nutricional por NPT es ventajoso para pacientes que reciben quimioterapia en los que la caquexia es un problema.

Nutrición y Errores Congénitos del Metabolismo

Las enfermedades metabólicas heredadas son el resultado de “errores congénitos” en genes que producen alteraciones en la estructura y función de enzimas u otras proteínas (ver capítulo 47). Elas y Costa [ref\(1507\)](#) indican que han sido reportados más de 250 trastornos en los que hay acumulación, deficiencia o sobreproducción de sustratos o de productos comprometidos en pasos metabólicos normales. Los autores reseñan alrededor de 100 de estos trastornos en los que la terapia nutricional es un componente integral del tratamiento. La intervención es obligatoria en las primeras semanas de vida en el caso de fenilcetonuria, galactosemia, acidemia isovalérica, homocistinuria, enfermedad del jarabe de arce, aciduria argininosuccínica y citrulinemia. La referencia 19 [ref\(1508\)](#) describe fórmulas químicamente definidas, medicamentos y guías dietéticas para muchas clases de trastornos metabólicos hereditarios, así como una extensa discusión sobre la bioquímica, procedimientos de tamizaje, diagnóstico y tratamiento de muchas de estas enfermedades.

Parametros Bioquimicos Usados para el Monitoreo del Estado Nutritionak

Monitoreo general [ref\(1509\)](#)

La evaluación cuidadosa del estado nutricional y el monitoreo de las terapias nutricionales comprenden tanto mediciones antropométricas como de laboratorio. En la Tabla 37-10 se resumen las propiedades de un marcador ideal para el monitoreo del estado nutricional en fluidos biológicos. Aunque estas propiedades no pueden ser totalmente cumplidas en todas las situaciones clínicas, permiten la interpretación del estado nutricional del paciente cuando son usadas junto a otras consideraciones sobre la condición del paciente. Los



paneles de tamizaje bioquímico de rutina aportan datos sobre requerimientos de hidratos de carbono y de macrominerales.

Síndrome de realimentación

Además de suministrar información sobre nutrientes específicos, las pruebas bioquímicas de rutina pueden ser también útiles para la evaluación de la respuesta general de los pacientes a la terapia nutricional. Específicamente, mediante un cuidadoso monitoreo bioquímico los médicos pueden evitar un aspecto negativo del tratamiento nutricional llamado “*síndrome de realimentación*”. El síndrome de realimentación comprende las consecuencias negativas que pueden resultar cuando los pacientes crónicamente poco alimentados y con malnutrición severa reciben un apoyo nutricional agresivo. Este síndrome puede comenzar cuando el individuo recibe más glucosa que la que puede ser procesada fisiológicamente. En condiciones normales, la glucosa puede ser metabolizada a razón de 2 a 4 mg/Kg/min como máximo. Bajo estrés, este valor puede elevarse a 3 a 5 mg/Kg/min. Si estos valores son excedidos, puede haber una respuesta insulínica exagerada. Además de su efecto hipoglucemiante (ver capítulo 32), la insulina tiene propiedades antidiuréticas importantes. Entonces, a partir de una respuesta insulínica exagerada, que puede ocurrir cuando un paciente malnutrido es tratado con una cantidad excesiva de glucosa, habrá retención de sal y agua, lo que aumentará el espacio vascular y llevará a una sobrecarga de fluidos, provocando estrés al corazón.

Otras consecuencias bioquímicas del exceso de insulina son la disminución del fosfato, magnesio y potasio séricos, ya que la insulina deriva estos compuestos hacia el interior de las células periféricas, principalmente las células musculares. En un organismo que ya tuviera deficiencia en estos nutrientes podría producirse hipofosfatemia, hipopotasemia e hipomagnesemia.

- Una deficiencia en magnesio sérico puede reducir la actividad de enzimas clave en los tejidos, especialmente el cardíaco.
- La hipofosfatemia puede llevar a niveles celulares disminuidos de ATP y, en los glóbulos rojos, de 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG). La disminución de 2,3-DPG altera la forma de los glóbulos rojos, disminuye su vida media y altera la unión del oxígeno a la hemoglobina (ver capítulos 25 y 36). Esto da como resultado una menor entrega de oxígeno a las células periféricas e hipoxia tisular.
- La hipopotasemia provoca un aumento de la irritabilidad del tejido cardíaco y reduce la capacidad de las células para captar la glucosa.

En un individuo severamente malnutrido por ingesta pobre de proteínas, los músculos se han debilitado porque las proteínas musculares han sido catabolizadas a aminoácidos que son consumidos en la gluconeogénesis para aumentar la disponibilidad de glucosa sanguínea para el cerebro. En esta condición de debilidad, actúan los factores de estrés bioquímicos enumerados anteriormente reduciendo aún más la capacidad funcional de los músculos, llevando a falla respiratoria e hipoxia tisular, lo que a su vez conduce a falla congestiva del corazón y paro cardíaco. Estas consecuencias de la terapia nutricional agresiva pueden ser

evitadas por un monitoreo cuidadoso de los niveles séricos de algunos compuestos analizados y la cooperación entre el médico, el laboratorio y el farmacéutico.

Balance Nitrogenado

La Tabla 37-11 muestra las pruebas que pueden ser usadas para monitorear el balance nitrogenado y estimar la capacidad del hígado para sintetizar proteínas. El balance nitrogenado puede ser estimado a partir de la dieta consumida y de la determinación de la excreción de urea urinaria en 24 horas. Para cada paciente debe determinarse un factor de ajuste para estimar la pérdida de nitrógeno por heces y por otras vías como la creatinina, ácido úrico, amoníaco, y pérdidas por formación de cabellos, uñas y sudor. Las limitaciones de este método en los enfermos críticos usando el factor urea urinaria x 1,25 g para estimar el nitrógeno total han sido discutidas.^{refs(1510)} Una medida más exacta de la excreción de nitrógeno puede lograrse por análisis directo del nitrógeno total (ver texto anterior y referencia 8^{ref(1511)})

Síntesis de Proteínas

La interpretación de los resultados de albúmina plasmática y otras proteínas específicas debe tener en cuenta la condición individual del paciente. Las alteraciones en el volumen de los fluidos y el movimiento de fluidos hacia dentro o hacia afuera del sistema vascular produce cambios en las concentraciones plasmáticas de albúmina y transferrina. Las condiciones que inician la fase de respuesta aguda como trauma, infección, malignidad e infarto de miocardio, pueden afectar los niveles de ciertas proteínas hepáticas específicas. Dentro de las proteínas específicas medidas comúnmente, la ceruloplasmina es un marcador positivo de la fase aguda, y sus niveles séricos se incrementarán por un aumento de su síntesis en el lugar de la lesión. Al mismo tiempo, los niveles séricos de los marcadores negativos de la fase aguda disminuyen por un mayor catabolismo y una menor síntesis. Por lo tanto, una disminución plasmática de transtiretina (prealbúmina), transferrina, proteína fijadora de retinol y albúmina puede producirse, al menos en parte, en condiciones distintas que la malnutrición. Sin embargo, el análisis de proteínas específicas de vida media corta es útil para monitorear la respuesta a la suplementación nutricional. La vida media de algunas de las proteínas específicas y los niveles sugeridos a los que la suplementación está indicada se muestran en la Tabla 37-12.

La respuesta a la suplementación proteica se refleja más rápidamente por una elevación en el nivel de proteína fijadora de retinol, pero la prealbúmina se ha mostrado más predictiva de la mejoría.

Referencias

1. *Recommended Dietary Allowances*, 10th edition, Subcommittee on the 10th Edition of the RDAs, Food and Nutrition Board, Commission on Life Sciences, National Research Council, National Academy Press, Washington, D.C., 1989.
2. Shils ME, Olson JA, Shike M, editors: *Modern nutrition in health and disease*, ed 8, Philadelphia, 1993, Lea & Febiger.
3. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW, editors: *Harper's biochemistry*, ed 23, Norwalk, Conn., 1993, Appleton & Lange.



4. World Health Organization: *Energy and protein requirements*, report of a joint FAO/WHO/UNU expert consultation technical report, series 724, Geneva, 1985, WHO.
5. Souba WW, Wilmore DW: Diet and nutrition in the care of the patient with surgery trauma and sepsis. In Shils, ME, Olson JA, Shike M, editors: *Modern nutrition in health and disease*, ed 8, Philadelphia, 1993, Lea & Febiger.
6. MacDonald I: Carbohydrates. In Shils ME, Olson JA, Shike M, editors: *Modern nutrition in health and disease*, ed 8, Philadelphia, 1993, Lea & Febiger.
7. Crim MC, Munro HN: Proteins and amino acids. In Shils ME, Olson JA, Shike M, editors: *Modern nutrition in health and disease*, ed 8, Philadelphia, 1993, Lea & Febiger.
8. Kaplan LA, general editor: Laboratory support in assessing and monitoring nutritional status, National Academy of Clinical Biochemistry's "Standards of Laboratory Practice" series, pp 12-13.
9. Linscheer WG, Vergroesen AJ: Lipids. In Shils ME, Olson JA, Shike M, editors: *Modern nutrition in health and disease*, ed 8, Philadelphia, 1993, Lea & Febiger.
10. Nordin BEC, editor: *Calcium in human biology*, London, 1988, Springer-Verlag.
11. Shils ME: Magnesium. In Shils ME, Olson JA, Shike M, editors: *Modern nutrition in health and disease*, ed 8, Philadelphia, 1993, Lea & Febiger.
12. Schneeman BO, Tietyen J: Dietary fiber. In Shils ME, Olson JA, Shike M, editors: *Modern nutrition in health and disease*, ed 8, Philadelphia, 1993, Lea & Febiger.
13. Report of National Cholesterol Education Program Expert Panel on Diet, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults, *Arch Intern Med* 48:36-69, 1988.
14. Anderson JW, Geil PB: Diabetes, *Am J Med* 85(suppl 5A):1259-1286, 1988.
15. Roe DA: Diet, nutrition, and drug interactions. In Shils ME, Olson JA, Shike M, editors: *Modern nutrition in health and disease*, ed 8, Philadelphia, 1993, Lea & Febiger.
16. Shils ME: Nutrition and diet in cancer management. In Shils ME, Olson JA, Shike M, editors: *Modern nutrition in health and disease*, ed 8, Philadelphia, 1993, Lea & Febiger.
17. Shike M: Enteral feeding. In Shils ME, Olson JA, Shike M, editors: *Modern nutrition in health and disease*, ed 8, Philadelphia, 1993, Lea & Febiger.
18. Shils ME: Parenteral nutrition. In Shils ME, Olson JA, Shike M, editors: *Modern nutrition in health and disease*, ed 8, Philadelphia, 1993, Lea & Febiger.
19. Elsas LJ, Acosta PB: Nutrition support of inherited metabolic disease. In Shils ME, Olson JA, Shike M, editors: *Modern nutrition in health and disease*, ed 8, Philadelphia, 1993, Lea & Febiger.
20. Konstantinides FN, Konstantinides NN, Lin JC, et al: Urine urea nitrogen: too insensitive for calculating nitrogen balance in clinical nutrition, *JPEN* 15:189-195, 1991.
21. Herbert V: Aseptic addition method for *Lactobacillus casei* assay of folate activity in human serum, *J Clin Pathol* 19:212-16, 1966.

Tablas

Tabla 37-1. Tipos básicos de nutrientes.

Nutriente	Capítulo en que se discute
Hidratos de carbono	Diabetes, 32
Lípidos	Lípidos, 33
Proteínas	Hígado, 27
Elementos inorgánicos	

Na, K, Cl	Electrolitos y balance de agua, 24
Ca, Mg, Pi	Hueso, 28
Fe ⁺⁺ (Fe ⁺⁺⁺)	Hierro, porfirinas, bilirrubina, 35
Oligoelementos	Oligoelementos, 38
Vitaminas	Vitaminas, 39
Agua	Riñón, 26
	Electrolitos y balance de agua, 24

Tabla 37-2. Ración Recomendada en la Dieta para proteínas para diferentes edades.

Categoría	Edad (años) o condición	<u>Peso</u>		<u>Altura</u>		Proteína (g)
		Kg	Libra	cm	pulgad	
Lactantes	0.0-0.5	6	13	60	24	3
	0.5-1.0	9	20	71	28	14
Niños	1-3	13	29	90	35	16
	4-6	20	44	112	44	24
	7-10	28	62	132	52	28
Hombres	11-14	45	99	157	62	45
	15-18	66	145	176	69	59
	19-24	72	160	177	70	58
	25-50	79	174	176	79	63
	51 +	77	170	173	68	63
Mujeres	11-14	46	101	157	62	46
	15-18	55	120	163	64	44
	19-24	58	128	164	65	46
	25-50	63	138	163	64	50
	51 +	65	143	160	63	50
Embarazadas						60
Mujeres en	1-6 meses					65
período de	6-12 meses					62
lactancia						
Según el Comité de Alimentos y Nutrición, Academia Nacional de Ciencias, Consejo Nacional de investigaciones: <i>Recommended Dietary Allowances</i> , revisado en 1989, Washington DC.						

Tabla 37-3. Ración recomendada en la dieta para algunos minerales y oligoelementos.

Categoría	Edad (años)	Ca (mg)	P (mg)	Mg (mg)	Fe (mg)	Zn (mg)	I (µg)	Se (µg)
-----------	----------------	------------	-----------	------------	------------	------------	-----------	------------

Lactantes	0.0-0.5	400	300	40	6	5	40	10
	0.5-1.0	600	500	60	10	5	50	15
Niños	1-3	800	800	80	10	10	70	20
	4-6	800	800	120	10	10	90	20
Hombres	11-14	1200	1200	270	12	15	150	40
	15-18	1200	1200	400	12	15	150	50
	19-24	1200	1200	350	10	15	150	70
	25-50	800	800	350	10	15	150	70
	51 +	800	800	350	10	15	150	70
Mujeres	11-14	1200	1200	280	15	12	150	45
	15-18	1200	1200	300	15	12	150	50
	19-24	1200	1200	280	15	12	150	55
	25-50	800	800	280	15	12	150	55
	51 +	800	800	280	10	12	150	55
Embarazadas	1200	1200	300	30	15	175	65	
Lactancia	1-6 meses	1200	1200	355	15	19	200	75
	6-12 meses	1200	1200	340	15	16	200	75
Según el Comité de Alimentos y Nutrición, Academia Nacional de Ciencias, Consejo Nacional de Investigaciones: <i>Recommended Dietary Allowances</i> , revisado en 1989, Washington DC.								

Tabla 37-4. Rol principal de los macrominerales y anormalidades asociadas.

Elemento	Anormalidad		Observaciones
	Función principal	asociada	
Calcio	Principal componente de los tejidos esquelético y dental junto fosforo	Deficiencia: raquitismo en niños. Osteomalacia en adultos; contribuye a la osteoporosis.	Regulación hormonal: hormona paratiroidea, vitamina D, calcitonina.
Cloruro	Importante en el equilibrio de fluidos y electrolitos; principal anión del fluido extracelular; contribuye a la osmolalidad.	La deficiencia haber puede suceder por vómitos, diarrea, diuréticos, enfermedad renal.	
Magnesio	Principal pool	Puede haber	Síntoma de defi-

	intracelular, hueso; cofactor de muchas enzimas.	deficiencia por malabsorción, diarrea, alcoholismo.	ciencia: debilidad muscular.
Fósforo	Principal componente de los tejidos esquelético y dental junto con el calcio. Fuente de energía como ATP. Intermediario fosforilado en el metabolismo. Componente de ácidos nucleicos.	Deficiencia: raquitismo en niños. Osteomalacia en adultos.	Mecanismos regulatorios de la hormona paratiroides y vitamina D.
Potasio	Principal catión intracelular; importante en las funciones muscular y nerviosa. Na^+ , K^+ -ATPasa.	Debilidad muscular. Confusión. Parálisis.	La aldosterona regula la excreción de K. Los diuréticos aumentan la pérdida urinaria.
Sodio	Principal catión extracelular. Contribuye a la osmolalidad. Importante en el equilibrio ácido-base. Na^+ , K^+ -ATPasa.	El exceso puede causar hipertensión en algunos individuos.	La aldosterona regula la reabsorción de Na.

Tabla 37-5. Condiciones que requieren consideraciones especiales de nutrición.

Vejez	Inmunoincompetencia
Alcoholismo	Enfermedad de kwashiorkor
Cáncer	Período de lactancia
Enfermedad coronaria	Lactante con bajo peso al nacer
Diabetes	Mala absorción
Crecimiento	Marasmo
Hiperlipidemia	Embarazo



Lesiones

Sepsis

Tabla 37-6. Ejemplos de fármacos que son antagonistas de vitaminas.*

Fármaco	Uso/efecto	Vitamina afectada
Adriamicina	Quimioterapia del cáncer; cardiomiopatía dosis-dependiente si la acumulación es la severidad del mayor de 500 mg/ m ² . El perfil histológico es similar al del de la deficiencia de vitamina E.	La suplementación con vitamina E reduce la incidencia y la severidad daño en animales pero no en el hombre.
Alcohol	Dificultad en la utilización de vitaminas B.	La administración de tiamina es beneficiosa, así como lo es en el síndrome de Wernicke-Korsakoff
Fármacos cu-marínicos Warfarina Dicumarol	Anticoagulantes.	Antagonistas de la vitamina K. Una alta ingesta de vitamina K reduce los efectos anticoagulantes
Hidralazina	Fármaco anti-hipertensivo	Antagonista de la vitamina B ₆ . Inhibe la síntesis de nicotinamida.
Isoniazida	Fármaco antituberculoso	Antagonista de la vitamina B ₆ . Inhibe la síntesis de nicotinamida.
Metotrexate	Quimioterapia del cáncer	Antagonista del folato
Moxalactama	Antibiótico	Disminuye los factores de coagulación vitamina K dependientes
Oxido nitroso	Anestésico. Importante en la cirugía cardíaca	Antagonista de la vitamina B ₁₂
Pentamidina	Terapia de la neumonía producida por	Antagonista del folato



Pneumocystis carinii

Pirimetamina	Agente antimalárico	Antagonista del folato
Sulfasalazina	Fármaco antiinflamatorio	Antagonista del folato
Tramterina	Diurético	Antagonista del folato
Trimetoprima	Antibiótico	Antagonista del folato

* Según D.A. Roe: Diet, Nutrition and Drug Interactions. En: *Modern Nutrition in Health and Disease*, 8 edición, 1993, Philadelphia, Lea and Febinger. Editores: M.E. Shils, J.A. Olson y M. Shike. Debe tenerse en cuenta que el antagonismo de una droga con una vitamina en modelos animales in vitro a menudo no está confirmado en humanos.

Tabla 37-7. Algunos tipos de drogas que influyen sobre el estado mineral.

Mineral	Estado mineral	
	Sobrecarga	Deprivación
Potasio	La succinilcolina eleva el potasio sérico, diuréticos que reponen el potasio	Laxantes; que diuréticos hacen perder potasio; antibióticos nefrotóxicos
Sodio	Antiácidos que contienen bicarbonato de sodio; el antihipertensivo diazóxido puede elevar el sodio sérico	Diuréticos que hacen perder sodio
Calcio	Diuréticos tipo tiazida-retención de calcio;etidronato (bifosfonato)-incremento de masa ósea; dosis farmacológicas de vitamina D y metabolitos-hipercalcemia y calcificación potencial de tejidos blandos	Antiácidos y fluidos parenterales que contienen aluminio potencial; osteomalacia corticosteroides; fenobarbital; fenitoína
Magnesio	Antiácidos que contienen magnesio	Antibióticos diuréticos, nefróticos, cisplatina
Hierro		Aspirina, indometacina
Zinc		Penicilamina, antibióticos nefróticos



Tabla 37-8. Condiciones en que la alimentación enteral está indicada.

Disfagia severa
Anorexia persistente
Coma
Síndrome del intestino grueso
Enfermedad inflamatoria intestinal
Obstrucción parcial
Náuseas y vómitos sin obstrucción intestinal
Excesivos requerimientos nutricionales, como en los
pacientes quemados
Fístula de intestino delgado o colon
Requerimiento de nutrientes específicos
Aspiración persistente vía yeyunostomía

Según M. Shike: Enteral Feeding. In: *Modern Nutrition in Health and Disease*, 8 edición, 1993, Philadelphia, Lea and Febinger. Editores: M.E. Shils, J.A. Olson y M. Shike.

Tabla 37-9. Estados clínicos de pacientes que pueden beneficiarse con la nutrición parenteral.

Incapacidad para digerir los alimentos
Vómitos persistentes (como los secundarios a la obstrucción,
presión alta o medicación intracraneal)
Trastornos de la motilidad intestinal (como la obstrucción
pseudointestinal aguda)
Resección intestinal masiva
Enfermedad intestinal inflamatoria severa
Fístula del intestino grueso que no puede ser eludida por
alimentación mediante tubos
Enfermedad inmune con atrofia de las vellosidades intestinales
Apoyo para el lactante prematuro de bajo peso
Estados hipermetabólicos persistentes en los que la alimentación
enteral está contraindicada o es inadecuada (como en las
quemaduras severas con trauma o sepsis)

Según M. Shike: Enteral Feeding. In: *Modern Nutrition in Health and Disease*, 8 edición, 1993, Philadelphia, Lea and Febinger. Editores: M.E. Shils, J.A. Olson y M. Shike.

Tabla 37-10. Propiedades de un marcador nutricional ideal.

Específico para el compuesto a ser medido
 Alta sensibilidad
 Indicativo del estado de un compuesto analizado particular
 Vida media biológica muy corta
 Respuesta rápida a la suplementación
 Indicación temprana del comienzo y grado de deficiencia

Tabla 37-11. Pruebas de laboratorio para monitorear la respuesta a los suplementos nutritivos.

Parámetro	Fundamento/Comentarios
Nitrógeno de urea en orina	<i>Aproxima</i> el balance nitrogenado en estados anabólico y catabólico
Nitrógeno total urinario	Medida directa del nitrógeno excretado
Albúmina plasmática	Disminuida en malnutrición; afectada por redistribución con movimiento o retención de fluidos
Transtiretina plasmática (prealbúmina)	Disminuida en malnutrición, vida media de 2 días; refleja la síntesis hepática de proteína
Transferrina plasmática*	Disminuida en malnutrición; vida media de 8 días
Proteína plasmática fijadora de retinol*	Disminuida en malnutrición; vida media de 10 horas
Zinc plasmático	Niveles bajos (500µg/L) con lesiones de la piel indican inmunoincompetencia
Triglicéridos plasmáticos	Esencial para monitorear la hipertrigliceridemia en la nutrición parenteral periférica
* Reactantes de fase aguda, ver texto.	



Tabla 37-12. Proteínas usadas en la evaluación nutricional.

Proteína	Vida media	Valores normales	Punto de sugerido decisión médica
Albúmina	21 días	35-55 g/	30 g/L
Transferrina	8 días	2000-4000 mg/L	1500 mg/L
Prealbúmina	2 días	160-350 mg/L	110 mg/L
Proteína fijadora de retinol	10 horas	26-76 mg/L	16 mg/L
Según L.A. Kaplan, general editor: <i>Laboratory support in assessing and monitoring nutritional status</i> . Academia Nacional de Bioquímica Clínica (N.A.C.B.). Serie "Standards of Laboratory Practice".			

CAPÍTULO 38

38. Oligoelementos

Nancy W. Alcock

Clasificación

Oligoelementos esenciales

Cobre
Cromo
Flúor
Yodo
Manganeso
Molibdeno
Selenio
Zinc

Metales tóxicos

Aluminio
Arsénico
Cadmio
Mercurio
Plomo

Consideraciones para evaluar el estado de los
oligoelementos en seres humanos



OBJETIVOS

- Discutir la función bioquímica primaria de los oligoelementos esenciales en los seres humanos.
- Presentar los síntomas clínicos asociados a una deficiencia o a un exceso de oligoelementos esenciales.
- Discutir la toxicidad en niveles traza de algunos metales.
- Discutir las consideraciones para evaluar de los metales traza en seres humanos.

Términos clave

caries dental Condición en la cual la dentina calcificada, el esmalte, o ambos, son destruidos por la acción de microorganismos o carbohidratos.

CRD Cantidad recomendada diaria de un micronutriente en la dieta.

dedos para zinc Regiones de unión específicas para el zinc (gracias a residuos de histidina y cisteína), que aparecen a intervalos definidos en las proteínas reguladoras. Estas proteínas se unen al ácido deoxirribonucleico (DNA) y regulan la expresión genética controlando la transcripción del mismo.

deficiencia Estado de un nutriente en el cual un síntoma o una función bioquímica anormales se revierte debido a la suplementación de dicho nutriente.

metaloioneína Proteína de 6200 daltones, con aproximadamente 30 % de su contenido de aminoácidos compuesto de cisteína, que se une firmemente a los iones siguientes en orden de afinidad $Cd > Cu > Zn$. Juega un papel importante en las interacciones zinc-cobre, siendo su síntesis fácilmente inducida por zinc.

micronutrientes Componentes esenciales de los alimentos que son requeridos o están presentes en el organismo en muy pequeñas cantidades. Incluye a las vitaminas y a algunos metales.

oligoelementos Elementos presentes en el organismo en muy pequeñas cantidades (microgramos/gramo o menos). Algunos son esenciales; otros pueden ser tóxicos, aún a niveles relativamente bajos. La mayoría son metales, con la excepción de los halógenos yodo y flúor.

oligoelemento esencial Todo elemento que, si es removido de la dieta, produce una anomalía bioquímica que se revierte por la suplementación con dicho elemento.

oligoelementos tóxicos Elementos presentes en el ambiente en cantidades anormales que son antagonistas de procesos bioquímicos. Cuando están presentes en tejidos en niveles elevados, pueden ser tóxicos e incluso fatales.

Clasificación^{ref(1512)}

De acuerdo a su función fisiológica, los oligoelementos pueden subdividirse en cuatro grupos principales:

1. Los elementos esenciales traza para los cuales se ha establecido una cantidad recomendada diaria en la dieta. Se ha demostrado que estos elementos son esenciales para el



crecimiento, desarrollo y mantenimiento normal, habiéndose identificado para ellos una función biológica específica. Los elementos de este grupo que se considerarán en el presente capítulo son zinc, yodo y selenio, cuyas CRDs se encuentran en la Tabla 38-1. El hierro, el más abundante de los metales esenciales, se discute en el capítulo 35. El hierro y el zinc son elementos de transición en la clasificación original de los elementos de Mendeleev, mientras que el selenio y el yodo son miembros de las series "normales" en los grupos VI y VII, respectivamente.

2. Oligoelementos para los que existe una evidencia definitiva de que juegan un papel esencial en el metabolismo humano, pero para los que no se ha establecido todavía las CRDs correspondientes. Ellos son los metales de transición cobre, manganeso, cromo, cobalto y molibdeno, además del flúor, halógeno del grupo VII. La ingesta inocua, y a la vez adecuada, estimada en la dieta para estos elementos se observa en la Tabla 38-2. El único requerimiento conocido para el cobalto en seres humanos es como componente de la molécula de la vitamina B₁₂, que se discute en el capítulo 39.

3. Los oligoelementos que se encuentran consistentemente en tejidos o fluidos biológicos en cantidades "ultra trazas", pero que todavía se desconoce si son esenciales o perjudiciales en tales niveles de concentración. Entre ellos figuran litio, níquel, estaño, silicio y vanadio. Éstos no se discutirán en el presente capítulo.

4. Los oligoelementos sin función biológica conocida en humanos, pero que cuando están presentes en niveles relativamente bajos, causan cambios patológicos. Estos elementos tóxicos se verán en el presente capítulo e incluyen aluminio, cadmio, mercurio, plomo y arsénico. El cadmio, arsénico y mercurio son elementos de transición, mientras que aluminio y plomo son miembros de las series normales en los grupos III y IV, respectivamente.

Olgoelementos Esenciales

En la Tabla 38-3 se muestra el papel biológico de los oligoelementos esenciales y algunas anomalías provocadas por la deficiencia o exceso de los mismos. Los intervalos de referencia, tomados de la bibliografía correspondiente, se enumeran en la Tabla 38-4 para los oligoelementos esenciales, y en la Tabla 38-5 para los metales tóxicos.

Cromo (Cr) [refs\(1513\)](#)

Es un elemento de transición del período 4 de la tabla periódica de elementos, con un peso atómico de 52.

Bioquímica.

Se ha demostrado que el cromo es un elemento esencial para el normal metabolismo de carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos. El cromo trivalente es un potenciador de la acción de la insulina.[ref\(1514\)](#) Se ha postulado que al encontrarse en el núcleo de la célula, se une a DNA, RNA y a las proteínas nucleares. Aparentemente está involucrado en el mantenimiento



de la integridad estructural de las cadenas nucleares y en la regulación de la expresión genética.[ref\(1515\)](#) Se cree que la forma biológicamente activa es un complejo orgánico que contiene cromo trivalente, ácido nicotínico, y glutatión o sus aminoácidos constituyentes. Sin embargo, la estructura exacta del complejo todavía no ha sido dilucidada. En el hombre, varios signos y síntomas son indicativos de la deficiencia de cromo. Entre ellos, tolerancia a la glucosa disminuida, insulina circulante elevada, glucosuria, glucemia elevada en ayunas, aumento de triglicéridos y colesterol, encefalopatía, y neuropatía.

La levadura de cerveza es una buena fuente del factor de tolerancia a la glucosa, pero se encontró que solamente un 5 % de su contenido total de cromo está asociado con la actividad potenciadora de insulina. No se sabe con exactitud cómo el cromo promueve la acción de la insulina in vivo. Podría unirse directamente a la insulina, o bien puede actuar aumentando el número de receptores o la afinidad de los mismos.

Significado clínico.[ref\(1516\)](#)

El estado del cromo en el organismo no ha sido satisfactoriamente caracterizado a partir de su concentración en suero u orina. Una razón es la dificultad asociada a su cuantificación exacta en los fluidos biológicos debido a la contaminación. El acero inoxidable, que contiene cromo, es una fuente común de contaminación en cantidades importantes. Anderson sugiere que, aun cuando el análisis de cromo se realice con sumo cuidado, los niveles en suero u orina pueden no ser indicativos de su estado en el organismo.[ref\(1517\)](#) Se ha demostrado con éxito la deficiencia de cromo al lograr una mejora en el metabolismo de glucosa o de lípidos en adultos como resultado de la administración de 200 microgramos de cromo por día durante varios meses. Los pacientes que reciben una nutrición totalmente parenteral por tiempo prolongado, corren el riesgo de presentar una deficiencia de cromo si los líquidos para la nutrición parenteral no son suplementados. En el primer caso reportado de deficiencia de cromo, el paciente mostró una tolerancia a la glucosa alterada con niveles normales de insulina y ácidos grasos elevados, además tuvo un cociente respiratorio reducido, anormalidades en el metabolismo del nitrógeno, y neuropatía. La infusión con insulina fracasó en el intento de mejorar la tolerancia a la glucosa o el cociente respiratorio, pero estos parámetros retornaron a la normalidad después de la suplementación con cromo.

La ingesta de cromo recomendada como inocua y adecuada se muestra en la Tabla 38-2. Se estima que menos del 2 % del cromo trivalente de la dieta se absorbe en el tracto gastrointestinal.

Toxicidad.

No se ha reportado toxicidad en humanos a partir de fuentes de cromo trivalente, pero ha sido asociada una incidencia elevada de cáncer de pulmón con la inhalación de cromo hexavalente por exposición industrial.[ref\(1518\)](#) En animales de experimentación, la ingesta en forma de cromato provoca daño hepático y renal. El cromo presente en detergentes y blanqueadores puede estar asociado a la incidencia de dermatitis.

Fuentes alimentarias.

El cromo se encuentra en los siguientes alimentos: levadura de cerveza, hongos, melaza, nueces, vino, cerveza, espárragos, ciruelas, carnes, quesos, y granos enteros. Es difícil establecer con exactitud el contenido de cromo presente en estos alimentos, dado que la



preparación para el análisis involucra normalmente la homogeneización en equipos con partes de acero inoxidable, y no puede evitarse cierto grado de contaminación.

Método. [refs\(1519\)](#)

La espectrofotometría de absorción atómica con atomización electrotérmica con horno de grafito es el método preferido de análisis. A pesar de que una lámpara halógena de tungsteno provee una corrección adecuada, son preferibles los instrumentos que utilizan el efecto Zeeman para corregir el ruido de fondo.

Intervalos de referencia.

Los adultos normales no suplementados excretan aproximadamente 0.5 microgramos de cromo por litro de orina, y tienen niveles séricos menores de 0.5 µg/Litro. [refs\(1520\)](#) En eritrocitos, la concentración es 20 a 36 µg/Litro.

Cobre (Cu) ⁹⁻[refs\(1521\)](#)

El Ccdica de los elementos.

Como cobre divalente, forma complejos con proteínas, muchos de los cuales son enzimas. Entre ellas, figura el grupo de las metaloenzimas con actividad de oxidasa, incluyendo la citocromo oxidasa, ferroxidasa (ceruloplasmina), superóxido dismutasa, lisina oxidasa, dopamina beta-hidroxilasa (β-hidroxilasa), espermina oxidasa, tirosinasa, uricasa, benzilamina oxidasa, diamina oxidasa, y triptofano 3,3-dioxigenasa. En los sistemas biológicos, el cobre tiene la capacidad de inducir la síntesis de metalotioneína, siendo en esta actividad intermediario entre el cadmio y el zinc. Aproximadamente el 50 % del cobre de la dieta se absorbe, proceso facilitado por la formación de complejos del cobre con aminoácidos. En plasma, aproximadamente el 95 % circula unido a la alfa₂-globulina (α₂-globulina), ceruloplasmina, una oxidasa con actividad de ferroxidasa. El cobre también es transportado unido débilmente a albúmina y una pequeña porción se acompleja con aminoácidos.

Aunque se ha determinado como inocua y adecuada una cantidad de 1.5 a 3 mg/día de cobre en la dieta (Tabla 38-2), se estima que el 35 % del total de las dietas en Estados Unidos proveen menos de 1 mg/día. Se excreta principalmente por vía biliar, siendo usualmente la excreción urinaria inferior a 40 µg/día.

Significado clínico:

En la dieta estadounidense, una ingesta de carbohidratos relativamente alta acompañada por una ingesta marginal de cobre, posiblemente potencia la deficiencia subclínica de este elemento. [ref\(1522\)](#) Existe evidencia que esta deficiencia marginal de cobre está asociada con enfermedad cardíaca, osteoartritis de hueso y articulaciones, y osteoporosis. La anemia microcítica hipocrómica, neutropenia, hipotermia y desmineralización también han sido asociadas a la deficiencia de cobre. En seres humanos, esta deficiencia conduce a la hipercolesterolemia [ref\(1523\)](#) y disminuye la protección antioxidante. En niños con el síndrome de Menkes, defecto genético asociado al cromosoma X, el proceso de absorción gastrointestinal de cobre está alterado, lo que provoca una deficiencia que conduce al deterioro cerebelar y cerebral. [ref\(1524\)](#)



La enfermedad de Wilson, de carácter hereditario autosómico recesivo, es un error en el metabolismo del cobre que provoca su excesiva acumulación en hígado, cerebro, córnea y riñones. Presenta niveles bajos de ceruloplasmina, y niveles altos de cobre no unido a la misma. La administración intravenosa de un agente quelante disminuye el cobre depositado en tejidos posibilitando su excreción. Un tratamiento reciente, más efectivo y sin efectos colaterales, es administrar por vía oral acetato de zinc, [ref\(1525\)](#) que inhibe la absorción de cobre.

Ha sido demostrado que la deficiencia marginal de cobre, especialmente en adultos, es difícil de detectar bioquímicamente. Milne [ref\(1526\)](#) afirma que las actividades disminuidas de citocromo oxidasa en leucocitos o de superóxido dismutasa en eritrocitos, constituyen probablemente el índice más confiable de niveles reducidos de cobre metabólicamente activo.

El cobre plasmático no es un indicador confiable del estado del elemento en el organismo. Aunque la privación de cobre por largos períodos, como sucede en tratamientos con nutrición parenteral total, resulta en niveles bajos de cobre; la terapia crónica con corticosteroides y ACTH también reducen niveles de cobre. Los factores que están asociados con un aumento de los niveles séricos de cobre incluyen anticonceptivos orales, embarazo, y procesos inflamatorios o infecciosos.

Fuentes de cobre en alimentos.

La mayoría de los alimentos contienen cantidades considerables, siendo los más ricos en cobre los siguientes: mariscos, hígado, riñón, yema de huevo y algunas legumbres.

Métodos.

Los métodos de análisis preferidos, son la espectrofotometría de absorción atómica con llama para suero o plasma, o con horno de grafito para orina, donde la concentración es comúnmente menor a 40 µg/L.

Intervalos de referencia.

Los niveles séricos o plasmáticos varían con la edad y son mayores en mujeres adultas que en hombres. Éstos se detallan en la Tabla 38-3. La mayoría del cobre se excreta a través de la bilis, y los niveles en orina comúnmente son inferiores a 40 µg/día.

Flúor (F) [refs\(1527\)](#)

Elemento halógeno, de peso atómico 19, es el primer miembro del período 2 del grupo VII de la tabla periódica.

Bioquímica.

El anión fluoruro puede substituir al ion hidroxilo en la estructura del cristal de hidroxiapatita en tejidos calcificados, hueso y diente. Se cree que la producción de un cristal "más duro" es la explicación del efecto protector del fluoruro contra la caries dental. [ref\(1528\)](#) También ha sido utilizado en forma terapéutica, sólo o en combinación con Vitamina D, en el tratamiento de la osteoporosis.

Importancia clínica.

Está ampliamente reconocida la asociación inversa entre la incidencia de la caries dental y la concentración de fluoruro, cuando ésta es menor o igual a 1 mg/L en agua potable.



Menos convincentes son los reportes acerca de los efectos terapéuticos beneficiosos del fluoruro de sodio en el tratamiento de la osteoporosis. [refs\(1529\)](#)

Requerimiento.

1 a 2 mg/día. Habitualmente, el suministro de agua potable fluorada con 1 mg/L de fluoruro provee el requerimiento diario.

Fuentes en alimentos.

Trazas de fluoruro están presentes en la mayoría de los alimentos, y en el agua potable, ya sea natural o suplementada en forma artificial.

Toxicidad.

Una alta ingesta de fluoruro causa *fluorosis dental*, caracterizada por dientes descoloridos y veteados. En zonas donde la concentración de fluoruro concentración es de 10 a 45 mg/L, aparecen una densidad ósea aumentada y calcificación de las inserciones musculares, evidenciadas radiográficamente.

Método.

El método de elección es la utilización de un electrodo selectivo de iones. [ref\(1530\)](#)

Intervalos de referencia. [ref\(1531\)](#)

Plasma: 0.01 a 0.2 µg/mL, 0.5 a 10.5 µmol/L. *Orina:* 0.2 a 1.1 µg/mL; 10.5 a 57.9 µmol/L.

Yodo (I) [refs\(1532\)](#)

Elemento halógeno, peso atómico 127, ubicado en el período 5 del grupo VII de la tabla periódica.

Bioquímica.

Aunque está ampliamente distribuido en la superficie terrestre, el mar es la principal fuente de yodo. Se estima que los yoduros provenientes del agua de mar, oxidados por acción de la luz solar a yodo elemental volátil, proveen cerca de 400,000 toneladas anuales de yodo a la atmósfera. La concentración de yoduro en el agua de mar es aproximadamente de 50 µg/L, y es similar a la del suero humano.

El yodo tiene importancia biológica como constituyente de las hormonas de la glándula tiroides, T₄ y T₃, tiroxina (3,5,3',5'-tetrayodotironina) y 3,5,3'-triyodotironina respectivamente, la cuales son sintetizadas por yodación de la tirosina (para más detalles ver el capítulo 44). Estas hormonas son esenciales para el crecimiento normal, diferenciación y desarrollo. La deficiencia de yodo ocurre en zonas donde el suelo está agotado de yoduro, ya que las fuertes lluvias y nieve provocan que el yodo se filtre a través del terreno. La incorporación de yodo a los materiales cosechados es directamente proporcional a la cantidad del mismo presente en el suelo. En países subdesarrollados todavía son frecuentes las enfermedades producidas por deficiencia de yodo.



Importancia clínica.

Las hormonas tiroideas maternas y fetales contribuyen al desarrollo fetal. La deficiencia de yodo durante el embarazo puede provocar aborto espontáneo, muerte en el parto, aumento de la mortalidad perinatal o infantil, anormalidades congénitas o cretinismo neurológico, hipotiroidismo fetal, y defectos psicomotores. En el niño y en el adolescente, el bocio, retardo mental, y retardo en el desarrollo, son signos prominentes de hipotiroidismo. También puede observarse cretinismo mixedematoso o neurológico. En adultos, el bocio endémico es causado por la deficiencia de yodo. El estado de yodo en el organismo puede ser determinado determinando los niveles séricos de hormonas tiroideas, o midiendo la excreción urinaria de yodo.[ref\(1533\)](#)

Requerimientos.

Varían con la edad (ver Tabla 38-1)

Fuentes en alimentos.

Son ricos en yodo los peces de mar y las algas marinas.

Toxicidad.

La ingesta prolongada de un exceso (más de 2 mg/día) provoca bocio y mixedema.

Métodos.

Los métodos de análisis recomendados para yoduro son el inmunoensayo[ref\(1534\)](#) de hormonas tiroideas y el electrodo selectivo de iones.

Intervalos de referencia[ref\(1535\)](#)

Ver el capítulo 44 para consultar los niveles de hormonas que contienen yodo. Los intervalos de referencia para yoduro inorgánico plasmático son 0.8 a 6.0 µg/L. El yoduro inorgánico urinario correlaciona con el nivel plasmático. El límite inferior del intervalo de referencia depende de la edad: 5 a 10 años, 32.5 µg/g creatinina; adolescentes, 50 µg/g creatinina y adultos, 75 µg/g creatinina.

Manganeso (Mn)[refs\(1536\)](#)

Es un elemento de transición, peso atómico 55, del período 4 de la tabla periódica.

Bioquímica.

Forma sales divalentes y trivalentes. Es importante para el metabolismo apropiado en tejido conectivo, y para el crecimiento físico y el desarrollo de las funciones reproductivas, interviniendo también en el metabolismo de carbohidratos y lípidos. Funciona como un activador enzimático, aunque otros cationes divalentes, particularmente el magnesio, pueden reemplazarlo. Las enzimas que tienen una alta especificidad por el manganeso son las glucosil transferasas y las enzimas mitocondriales piruvato carboxilasa y superóxido dismutasa.[ref\(1537\)](#) El contenido total de manganeso en el organismo adulto es de 12 a 20 mg, de los cuales el 25 % está en el esqueleto. La ingesta habitual varía entre 1.7 a 8.3 mg/día, absorbiéndose de 2 % a 15 % del total. La absorción es inhibida por la presencia de otros cationes divalentes,



incluyendo Fe, Ca, y Mg, así como por fosfato, fibras y fitato. Se excreta a través del conducto biliar y por orina.

Importancia clínica.

La deficiencia de manganeso en seres humanos no ha sido demostrada categóricamente. Existen reportes anecdóticos acerca de la asociación con una deficiencia experimental de vitamina K que no han sido validados.[ref\(1538\)](#) Se sospecha una deficiencia de manganeso en anormalidades de cadera, enfermedades articulares, deformidades congénitas de esqueleto, y en la epilepsia infantil. Pueden observarse niveles elevados de manganeso eritrocitario en artritis reumatoide. Se han reportado niveles séricos aumentados en infarto de miocardio, hepatitis aguda y en exposición ocupacional a manganeso. La intoxicación a nivel ocupacional produce efectos psiquiátricos semejantes a la esquizofrenia y desórdenes neurológicos similares a los encontrados en la enfermedad de Parkinson. Los síntomas provocados por la disminución de la dopamina presente en la intoxicación con manganeso pueden ser revertidos por la administración de L-dopa, el precursor de la dopamina.[ref\(1539\)](#)

Requerimiento.

En la Tabla 38-2 se detalla la ingesta considerada inocua y adecuada para varias edades.

Fuentes en alimentos.

Son ricos en manganeso el salvado y el trigo, mientras que los granos más refinados y la carne contienen poco manganeso.

Toxicidad.

La exposición ocupacional prolongada provoca cambios neurológicos similares a los de la enfermedad de Parkinson.[ref\(1540\)](#)

Método.

El procedimiento analítico de elección es la espectrofotometría de absorción atómica utilizando horno de grafito y corrector Zeeman. Se recomienda utilizar nitrato de magnesio como modificador de matriz.[ref\(1541\)](#)

Intervalos de referencia.

Sangre entera: aproximadamente 11 µg/L (200 nmol/L); *suero:* 0.5 a 1.5 µg/L (9 a 27 nmol/L) y *orina:* 0.2 a 0.5 µg/día (3.6 a 9.0 nmol/L).

Molibdeno (Mo)[refs\(1542\)](#)

Elemento de transición, peso atómico 96, del período 5 de la tabla periódica.

Bioquímica.

Es cofactor de las metaloenzimas xantino oxidasa, sulfito oxidasa y aldehído oxidasa, por lo tanto participa en la vía metabólica de purinas a ácido úrico, los estadios finales de la oxidación de aminoácidos que contienen azufre, y la oxidación de aldehídos, respectivamente.



La absorción de molibdeno en el tracto gastrointestinal puede ser inhibida por competencia con el cobre de la dieta, sí la ingesta de éste último es elevada.

Importancia clínica.

La mayoría de la evidencia disponible acerca del papel del manganeso en el metabolismo proviene de estudios con animales. La ingesta elevada de molibdeno inhibe la utilización de cobre, efecto potenciado por una ingesta elevada de sulfatos. La retención de molibdeno disminuye por la presencia de un exceso de cobre o de sulfatos.[ref\(1543\)](#) Un aumento en la ingesta de molibdeno causa aumento en los niveles séricos de ácido úrico y desarrollo de gota.

Se ha reportado un caso de deficiencia de molibdeno en un paciente que recibía nutrición parenteral total.[ref\(1544\)](#) Los niveles elevados del aminoácido metionina y la excreción disminuida de ácido úrico y de sulfatos fueron corregidos por la administración de molibdeno, demostrando así la actividad reducida de las metaloenzimas que contienen molibdeno en pacientes con deficiencia de este elemento.

Requerimiento.

Se estima que la ingesta diaria considerada inocua y adecuada varía entre 10 µg en la niñez a 250 µg en adultos.

Fuentes en alimentos.

Leche, productos lácteos, carne, legumbres secas y cereales.

Toxicidad.

Han sido documentados valores sanguíneos elevados de molibdeno asociados a niveles altos encontrados en suelo y plantas en un solo reporte proveniente de Armenia.[ref\(1545\)](#) Se reportaron síntomas característicos de gota y otros que podrían indicar posible participación del hígado, riñón y tracto gastrointestinal.

Método.

Espectrofotometría de absorción atómica con horno de grafito.[ref\(1546\)](#)

Intervalos de referencia.

En suero de 0.1 a 3.0 µg /L.

Selenio (Se)[refs\(1547\)](#)

Elemento de peso atómico 79 perteneciente al período 4, grupo VI de la tabla periódica.

Bioquímica.[ref\(1548\)](#)

Es miembro del mismo grupo de elementos del oxígeno y del azufre. Aunque la bioquímica del selenio no ha sido completamente caracterizada, se sabe que en plantas se presenta predominantemente como selenometionina, mientras que en animales la selenocisteína es la forma predominante. Cuatro átomos de selenio están unidos covalentemente a residuos

1556



de cisteína de la enzima glutatión peroxidasa, que tiene fuertes propiedades antioxidantes y que, en modelos animales, actúa sinérgicamente con la vitamina E. Esta enzima está presente en el citoplasma y en las mitocondrias de los tejidos, encontrándose también en eritrocitos, plaquetas y plasma. Ha sido identificada recientemente una segunda enzima de tipo 1, la yodotironina deyoasa que contiene un átomo de selenio por molécula, la cual interviene en la conversión de T_4 a T_3 .[ref\(1549\)](#)

El selenio ingresa en la cadena alimentaria a través de las plantas. Debido a la gran variabilidad del rango de concentración de este elemento en distintas zonas del mundo, puede ocurrir una baja disponibilidad de selenio, mientras que en otras regiones seleníferas, el exceso de selenio es incorporado por las plantas.[ref\(1550\)](#) En estudios en seres humanos, la biodisponibilidad de selenio a partir de trigo, atún y hongos fue 83 %, 57 % y 5 %, respectivamente, comparado con la de selenito de sodio. Sin embargo, la forma en la cual se presenta el selenio en los alimentos es aún desconocida.

Importancia clínica.

Aunque no se ha identificado ningún marcador para evaluar el estado del selenio en el organismo, su concentración plasmática es un indicador de ingestión reciente. La actividad de la glutatión peroxidasa eritrocitaria y plaquetaria se correlaciona con la suplementación con selenio en pacientes en tratamiento domiciliario con nutrición total parenteral.[ref\(1551\)](#) El selenio urinario varía con la ingesta, y a niveles muy elevados de la misma, se exhalan formas volátiles de selenio. Las uñas y el pelo, que contienen proteínas con alto contenido de azufre o selenio, han sido utilizados para evaluar el estado del selenio en el organismo. En Estados Unidos, el uso de shampoo conteniendo selenio impide la utilización del pelo para realizar dicha medición.

Se ha reconocido un estado de bajo selenio cuando la ingesta del mismo es inferior a la CRD señalada en la Tabla 38-1; la ingestión crónica de cantidades por encima de la CRD conduce a la aparición de síntomas clínicos. Experimentalmente, se ha comprobado un efecto protector del selenio contra la toxicidad de elementos tales como mercurio, cadmio, y plata, sugiriendo que este elemento tendría en el organismo una función preventiva.

La deficiencia de selenio ha sido demostrada en Keshan, una ciudad de Manchuria, China, zona en la cual el contenido de selenio en suelo es muy bajo.[ref\(1552\)](#) Aunque la enfermedad de Keshan, a menudo asociada con cardiomiopatía en niños y mujeres jóvenes, respondió a la suplementación con selenio, la deficiencia del elemento no se cree que sea la única causa de esta condición, y se ha considerado la participación de un virus u otro agente. En otros países, como Nueva Zelandia, Finlandia y Suecia, donde también se ha demostrado un estado de bajo selenio, los efectos nocivos del bajo contenido de selenio en suelo no han sido observados. Una segunda enfermedad asociada a una baja ingesta de selenio en China, es la enfermedad de Kashin-Bek que causa degeneración del cartílago y osteoartritis en adolescentes y preadolescentes. Los pacientes sometidos por largos períodos a nutrición parenteral total tienen riesgo de desarrollar una deficiencia de selenio si los fluidos no son suplementados. Han sido reportados numerosos casos, y han ocurrido varias muertes asociadas a cardiopatías.

Requerimiento.

La CRD para selenio se muestra en la Tabla 38-1 y varía desde 10 μg para niños hasta 1557



75 µg en adultos.

Fuentes en alimentos.

Las fuentes de selenio de la dieta en orden decreciente de magnitud son: carne y pescado, cereales y granos, productos lácteos, frutas y vegetales.

Toxicidad.

Se caracteriza por dermatitis, pérdida del cabello, y uñas enfermas. La intoxicación por selenio resultante de la ingesta excesiva de suplementos provoca toxicidad aguda, y los síntomas incluyen sabor metálico, "olor a ajo", irritación de las mucosas, gastroenteritis, aparición de panadizos y enrojecimiento de uñas, cabello y dientes.[ref\(1553\)](#) Existe evidencia que la ingesta crónica de cantidades moderadamente elevadas de selenio puede tener efecto carcinogénico. Irónicamente, se está estudiando activamente la administración oral de compuestos con selenio como agentes preventivos de cáncer. En ciertos modelos tumorales, la selenometilselenocisteína tiene una mayor actividad antitumoral que el selenito de sodio, que es más activo que la selenometionina.

Método.[ref\(1554\)](#)

El método recomendado es la espectrofotometría de absorción atómica con horno de grafito y corrector Zeeman, utilizando nitrato de níquel o paladio reducido como modificador de matriz.

Intervalos de referencia.

Los niveles en suero [ref\(1555\)](#) varían de región en región dependiendo del contenido de selenio en suelo y en las fuentes alimenticias. En Estados Unidos, los niveles séricos promedio (± 1 SEM) para adultos son 1.10 (± 0.10) µmol/L en hombres y 1.20 (± 0.18) µmol/L en mujeres.

Zinc (Zn)[refs\(1556\)](#)

Elemento de transición, peso atómico 65, ubicado en el período 4 de la tabla periódica.

Bioquímica.

El zinc forma complejos estables, denominados *dedos de zinc*, con las proteínas a través de los aminoácidos histidina y cisteína. Es un componente importante de más de 200 metaloenzimas, entre las que se destacan aquellas involucradas en la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas, como DNA polimerasa, RNA polimerasa y transcriptasa reversa. Las proteínas de regulación que contienen dedos de zinc son fundamentales para la expresión genética.

El zinc induce la síntesis de metalotioneína, que posee una importante función en la regulación del metabolismo del zinc y del cobre. Esta proteína se une más firmemente al cobre que al zinc formando un complejo no absorbible en el tracto gastrointestinal, disminuyendo así la absorción de cobre. En el hígado, la inducción de la síntesis de la metalotioneína es significativo en casos de estrés e infección en que el zinc es secuestrado por este órgano. Los



dedos de zinc, definidos como dominios de proteínas unidas a zinc que también se unen a DNA, están involucrados en la expresión genética de la metalotioneína.

El zinc es un catión intracelular presente en todos los tejidos y fluidos del organismo y, después de hierro, es el segundo oligoelemento en orden de abundancia presente en el hombre. El contenido total de zinc en el organismo es 2 gramos, de los cuales el músculo contiene del 50% al 60%. El 28% de los depósitos del zinc está en hueso y 0.5% se encuentra en la sangre.

Los eritrocitos contienen del 75% al 88% del zinc sanguíneo. Del total de zinc presente en plasma (valor normal 700 a 1200 $\mu\text{g/L}$), aproximadamente 18% circula unido firmemente a una alfa2-macroglobulina, 80% se une débilmente a albúmina, 2% a transferrina, ceruloplasmina o los aminoácidos histidina y cisteína, y sólo una pequeña fracción se presenta como zinc libre.

La CRD de 15 mg para hombres y de 12 mg para mujeres probablemente no se alcanza en la dieta consumida por los adultos en Estados Unidos. La carne roja es la principal fuente de zinc biodisponible, y por ello, los vegetarianos tienen el riesgo de padecer insuficiencia de zinc. Además, el alto contenido de fibra presente en la dieta vegetariana se une al zinc, disminuyendo su biodisponibilidad. Aproximadamente se absorbe el 20% del zinc presente en una dieta no vegetariana común. La absorción aumenta con el consumo de carne, hígado, huevos y pescado, mientras que vegetales, granos enteros, fibras, fitatos, hierro y calcio la inhiben.

Importancia clínica.

El zinc es un componente necesario para la replicación celular, porque es requerido para la actividad de enzimas críticas para la síntesis de proteínas y la replicación de ácidos nucleicos. El suministro de cantidades adecuadas de zinc es imperativo para el normal desarrollo del feto. En el embarazo temprano, los niveles de zinc disminuyen a pesar de una ingesta aumentada. Durante el embarazo, hay un aumento en la fracción plasmática de zinc unida a la α_2 -macroglobulina y una disminución en el zinc unido a albúmina. El zinc plasmático está elevado durante la lactancia.

La deficiencia de zinc fue descrita por primera vez por Prasad y cols. en Irán y Egipto. [ref\(1557\)](#) Los adolescentes de sexo masculino mostraban retraso en el crecimiento e hipogonadismo. La deficiencia experimental provocada en animales se caracteriza por anormalidades en feto, daños en la embriogénesis y en el desarrollo cerebral, y visión deteriorada. La deficiencia aguda de zinc en seres humanos, especialmente en niños en edad de crecimiento, se manifiesta a través de lesiones en la piel, especialmente en extremidades o alrededor de orificios, diarrea, irritabilidad, pérdida de cabello, retraso en el crecimiento, y susceptibilidad aumentada a las infecciones. Una anormalidad hereditaria de tipo autosómico recesivo que dificulta la absorción normal de zinc en el tracto gastrointestinal fue descrita por primera vez por Moynahan y Barnes. [ref\(1558\)](#)

En condiciones tales como anemia falciforme, algunos cánceres, y traumas incluyendo quemaduras, estrés e infecciones agudas, los niveles plasmáticos de zinc pueden disminuir abruptamente, probablemente como resultado de su redistribución a otros tejidos como el hígado.

La alteración de la función inmunológica está asociada a una insuficiencia de zinc. La estimulación de linfocitos por fitohemaglutinina y concavalina A in vitro, está aumentada por 1559



la presencia de zinc. In vivo, una respuesta tardía hipersensitiva a alérgenos de la piel aparece consistentemente de acuerdo con el grado de deficiencia de zinc.

Aún no se ha podido identificar un marcador confiable para la evaluación del estado del zinc en el organismo. Aunque los niveles plasmáticos anormales están asociados con muchas condiciones patológicas, las concentraciones de zinc en plasma son un indicador poco confiable del estado del elemento en el organismo. Los niveles plasmáticos de zinc pueden disminuir en respuesta a estrés o trauma, pero no reflejan el estado intracelular. El zinc presente en leucocitos ha sido sugerido como un marcador confiable, pero todavía se aguardan hallazgos más consistentes al respecto. La excreción urinaria en respuesta a una exposición a zinc ha sido explorada como marcador de nutrición, así como el nivel de zinc en pelo. Son necesarias investigaciones más exhaustivas antes de recomendar a alguno de los posibles marcadores mencionados. En un estudio reciente, [ref\(1559\)](#) utilizando isótopos estables de zinc, se demostró que en mujeres premenopáusicas el zinc desaparece más rápidamente en aquellas previamente diagnosticadas como deficientes de zinc. En concordancia con un estudio anterior, se sugirió una relación inversa entre la ferritina sérica y el estado del zinc en el organismo. Ha sido demostrada una fuerte asociación entre el zinc y el hierro. La deficiencia marginal de zinc es bastante común y debería ser considerada como un problema de salud pública. [ref\(1560\)](#)

Requerimiento.

La CRD para zinc se muestra en la Tabla 38-1. Se recomienda un aumento en la ingesta de 30 mg/día durante el embarazo.

Fuentes alimentarias.

Carne, pescado, leche y huevos son buenas fuentes de zinc. Aunque algunos vegetales contienen cantidades apreciables de zinc, la presencia de altas concentraciones de fibra y fitato en estos alimentos son la causa de su baja biodisponibilidad.

Toxicidad.

Dolor epigástrico, diarrea y vómitos han sido observados luego de la ingesta de altas cantidades de zinc proveniente de alimentos almacenados en recipientes galvanizados. Suplementos de cantidades tan pequeñas como 25 mg de zinc disminuyen la absorción de cobre, presumiblemente por competencia.

Método. [ref\(1561\)](#)

El método de análisis preferido es la espectrofotometría de absorción atómica en suero o plasma, eritrocitos, y orina.

Intervalos de referencia.

Suero 700 a 1200 µg /L; 10.7 a 18.3 µmol/L. *Orina*: 300 a 500 µg /día; 4.58 a 7.64 µmol/día.

Metales Tóxicos



Aluminio (Al)^{refs(1562)}

El aluminio está clasificado como un elemento del período 3 de la tabla, con peso atómico 27.

Toxicidad.

Puede resultar de la exposición a fuentes industriales de aluminio, pero la iatrogenia es la causa más común. Los pacientes con insuficiencia renal son de alto riesgo de intoxicación por aluminio debido a dos fuentes. Primero, estos pacientes utilizan antiácidos que contienen hidróxido de aluminio para disminuir la absorción de fosfatos. Segundo, el aluminio puede estar presente en el dializado utilizado en la diálisis crónica de pacientes en los últimos estadios de enfermedad renal. Un segundo grupo de pacientes potencialmente vulnerables a la toxicidad por aluminio son aquellos que reciben nutrición parenteral total (NPT), particularmente los bebés prematuros debido a su reducida capacidad de depuración renal. Se encontró que los hidrolizados de caseína contienen altas concentraciones de aluminio,^{refs(1563)} y más recientemente, se ha demostrado que componentes como calcio y fosfato^{ref(1564)} contienen una apreciable contaminación con aluminio.

En todos los casos de toxicidad por aluminio, los dos órganos afectados son el cerebro y el sistema óseo.^{refs(1565)} Aunque las bases bioquímicas de los efectos neurotóxicos del aluminio son inciertas, se encontró en autopsias una asociación entre concentraciones altas de aluminio en cerebro y la demencia por diálisis o la encefalopatía por diálisis en un gran número de pacientes con daño renal sometidos a diálisis crónica. Por el contrario, no ha sido reportado uniformemente el hallazgo de niveles altos de aluminio en cerebro de pacientes con la enfermedad de Alzheimer.

En hueso, ha sido demostrado el depósito de aluminio a lo largo del frente de calcificación. La aparición de dolores óseos en pacientes con diálisis indicaría una excesiva acumulación de aluminio. En estos casos, la morfología del hueso asemeja la de la osteomalacia (ver capítulo 28). Otro signo importante de la toxicidad por aluminio es la anemia microcítica.

El uso de aminoácidos libres en reemplazo de hidrolizados de caseína reduce considerablemente la carga de aluminio en nutrientes preparados en forma artificial que se utilizan como suplementos en la nutrición enteral o parenteral. El hallazgo de cantidades variables de aluminio en diferentes lotes del mismo ingrediente, del mismo o de distintos fabricantes, enfatiza la necesidad de monitorear el contenido de aluminio en las soluciones para nutrición parenteral total. Los grupos de trabajo que intentan estandarizar el contenido de aluminio en estas soluciones apoyan la propuesta de la F.D.A. para establecer un límite de 25 µg de aluminio por litro de fluido parenteral. También se ha sugerido que otros componentes de las soluciones para nutrición parenteral total, incluyendo minerales, metales trazas, vitaminas y heparina, deberían informar en su etiqueta el contenido de aluminio presente. Otros fluidos intravenosos, como los que contienen inmunoglobulinas y la albúmina, también exhiben cantidades variables de aluminio.

Niveles séricos e indicaciones para el tratamiento.

Los intervalos de referencia para el aluminio en suero varían según los laboratorios



debido a la facilidad de contaminación. Puede considerarse como límite superior aceptado 4 $\mu\text{g/L}$ (0.15 $\mu\text{mol/L}$). Los niveles de aluminio sérico no reflejan necesariamente la cantidad de metal depositado en hueso, hígado o cerebro. El dolor óseo es un buen indicador clínico del grado de toxicidad. Durante la diálisis, la efectividad de la terapia con quelantes como la desferroxamina, puede ser monitoreada determinando los niveles de aluminio en suero.

Método.

Espectrofotometría de absorción atómica con horno de grafito y corrector Zeeman, usando nitrato de magnesio como modificador de matriz.[ref\(1566\)](#)

Arsénico (As)[refs\(1567\)](#)

Es un elemento del período 4 de la tabla, con peso atómico 75.

Toxicidad.

Existe evidencia que una muy pequeña cantidad de arsénico es esencial para el organismo.[ref\(1568\)](#) También se ha demostrado que brinda un efecto protector contra la selenosis.[ref\(1569\)](#) En tejidos, se presenta en sus estados trivalente y pentavalente. Los compuestos orgánicos de arsénico conteniendo grupos metilo son los más importantes desde el punto de vista bioquímico. En algunas moléculas biológicas el arsenato puede reemplazar al fosfato.

La toxicidad relativa del trióxido de arsénico por vía oral es baja: se estima que la dosis aguda fatal sería de 10.2 a 26 nmol (0.76 a 1.95 μg) de arsénico por kilogramo de peso corporal. En experimentos con animales, 10 g de arsenobetaína/Kg de peso corporal, produjo síntomas que desaparecieron dentro de la hora siguiente.

El arsénico está presente en todos los tejidos, encontrándose las concentraciones más altas en piel, pelo y uñas,[ref\(1570\)](#) debido a la unión del arsénico con los grupos sulfhidrilo (-SH) de las proteínas. Los síntomas de toxicidad aguda en humanos, a partir de una ingesta oral de arsénico, son náuseas, vómitos, diarrea, ardor en boca y garganta, y fuertes dolores abdominales.[ref\(1571\)](#) La exposición crónica a pequeñas dosis tóxicas provoca debilidad, adinamia, dolores musculares, y en niños, pérdida de la audición a bajas frecuencias. Dolores de cabeza, somnolencia y confusión aparecen tanto en la toxicidad aguda como en la crónica. Aunque no está claramente definido el mecanismo de aparición de los síntomas, el arsénico probablemente inhibe la actividad enzimática.

La absorción de formas orgánicas de arsénico por el tracto gastrointestinal y su excreción urinaria son procesos altamente eficientes. La excreción urinaria es un modo efectivo de monitorear su estado en el organismo.[ref\(1572\)](#) Se requiere de técnicas refinadas, como la cromatografía líquida de alta eficacia (más conocida bajo su abreviatura inglesa HPLC por "High Performance Liquid Chromatography") para caracterizar en que forma se excreta el arsénico.

Tratamiento.[refs\(1573\)](#)

En seres humanos, ha dado buenos resultados en el tratamiento de la intoxicación aguda, la utilización de D-penicilamina, 2,3-dimercapto-1-propanosulfonato, ácido 2,3-dimercaptosuccínico, o 2,3-dimercaptopropanol (BAL).



Método.

Espectrofotometría de absorción atómica sin llama.

Cadmio (Cd)[refs\(1574\)](#)

Elemento del período 5 de la tabla, con peso atómico 112.4.

Toxicidad.

Los principales órganos afectados son el hígado y el riñón.[ref\(1575\)](#) La toxicidad por cadmio puede ser el resultado de la formación de cadmio-metalotioneína, que previene la habitual unión de zinc y de cobre a la misma proteína, afectando así el normal funcionamiento de los órganos mencionados.

Importancia clínica.

En lactantes, está presente en muy bajas concentraciones, pero se acumula rápidamente dentro de los primeros 3 años de vida y continúa acumulándose hasta aproximadamente los 50 años de edad. El nivel en sangre, habitualmente menor de 1 µg/L, aumenta alrededor de 50 % en fumadores.[refs\(1576\)](#) La excreción urinaria normal es aproximadamente 1 µg/L, y también es mayor en fumadores.

En el intestino sólo se absorben cantidades muy pequeñas de cadmio. El metal absorbido se almacena en hígado, y preferentemente en la corteza renal. La formación de cadmio-metalotioneína en estos órganos explica la retención que ocurre en los mismos.[ref\(1577\)](#) Se estima que la vida biológica del cadmio es aproximadamente 30 años. En riñón, se postula que cantidades pequeñas de cadmio reducen el número de sitios de unión de la metalotioneína disponibles para zinc y para cobre, interfiriendo así en la función normal de la metalotioneína de dicho órgano. La inhalación de cadmio provoca daño renal aún antes de detectar una función pulmonar deteriorada, produciendo proteinuria de bajo peso molecular y un índice reducido de filtración glomerular. La osteomalacia (enfermedad de itai itai) que aparece en mujeres japonesas ha sido atribuible a una exposición a cadmio.[ref\(1578\)](#)

No se han demostrado todavía los indicios que asociaban el nivel de cadmio en agua potable con la hipertensión.

Tratamiento.

Se ha encontrado que la terapia de quelación es efectiva inmediatamente después de la exposición tóxica a cadmio, pero disminuye su efectividad con el tiempo transcurrido. Probablemente suceda que el pentaacetato de dietilentriamina utilizado no actúa en forma efectiva quelando el menos accesible cadmio intracelular. Sin embargo, si se administra BAL en forma continua, se demostró que aumenta la excreción biliar de cadmio.[ref\(1579\)](#)

Método.

Espectrofotometría de absorción atómica sin llama.

Plomo (Pb)[refs\(1580\)](#)



Se lo considera como un metal pesado, ubicado en el período 6 de la tabla periódica de elementos, con peso atómico de 207.

Toxicidad.

La mayor fuente de plomo en el ambiente, además de los residuos industriales, es la pintura en base a plomo utilizada en el interior y en el exterior de casas de madera. La remoción o el deterioro de la pintura lleva a una contaminación de agua y suelo, y a una posible contaminación por plomo en niños. Otras fuentes potenciales de contaminación han sido eliminadas, como las bombas que contienen plomo usadas para el suministro de agua corriente, o la soldadura de plomo para fabricar envases para alimentos.

In vitro, el plomo inhibe varias enzimas de la síntesis del grupo hemo. Las enzimas citosólicas ácido delta-aminolevulínico sintetasa y ácido delta aminolevulínico dehidratasa son fácilmente inhibidas por plomo.[ref\(1581\)](#) Sin embargo, este efecto no ha sido inequívocamente demostrado in vivo. La anemia aparece en individuos cuyo plomo en sangre excede 400 µg/L (1.92 µmol/L). Tanto en la deficiencia de hierro como en la intoxicación con plomo existe una incorporación disminuida del ion ferroso a la protoporfirina IX, paso necesario para la síntesis del hemo, y ocurre el reemplazamiento de hierro por el zinc para formar protoporfirina de zinc. La protoporfirina eritrocitaria comienza a aumentar a un nivel de plomo en sangre cercano a los 200 µg/L.

La absorción de plomo en intestino aumenta cuando también está presente una deficiencia de hierro, calcio, magnesio, zinc, fosfato o vitamina D.[ref\(1582\)](#) En el tratamiento preventivo o terapéutico de la intoxicación por plomo, se sugiere la utilización de suplementos en la dieta que contengan uno o más de estos nutrientes.

Importancia clínica de la toxicidad por plomo.

En el organismo, la toxicidad por plomo produce cambios neurológicos, gastrointestinales, renales, inmunológicos, endocrinológicos y hematopoyéticos. Los niños de 6 meses a 6 años de edad son los más afectados, dado que el plomo atraviesa la barrera hematoencefálica a una edad en la cual el crecimiento es rápido y cuando el desarrollo del cerebro es crítico. Aunque los efectos perjudiciales del plomo se conocen desde hace años, se cree actualmente que dichos efectos aparecen a concentraciones de plomo en sangre más bajas de las que previamente se creía. Los trabajos de Needleman y otros[refs\(1583\)](#) demostraron en forma convincente una disminución en el coeficiente intelectual de niños con niveles de plomo en sangre tan bajos como 100 µg/L. Al comprobar esa situación se reconoció la magnitud del problema, que afecta a millones de niños, y se generó el compromiso de emprender esfuerzos generales para prevenir o minimizar la posibilidad del aumento a la exposición al plomo. En 1991, el Centro para el Control de Enfermedades (más conocido bajo su abreviatura inglesa C.D.C. por “Centers for Disease Control”) publicó un informe acerca de la prevención de la intoxicación con plomo en niños pequeños.[ref\(1584\)](#)

Niveles de plomo en sangre.[refs\(1585\)](#)

Aunque habitualmente se considera inocuo un nivel de plomo en sangre inferior a 100 µg/L, existe evidencia que concentraciones aún menores pueden ser perjudiciales para niños en edad de crecimiento. A pesar de que no ha sido especificada ninguna acción al respecto, el C.D.C. ha sugerido una evaluación diagnóstica y tratamiento médico en niños con niveles superiores a



200 $\mu\text{g/L}$. Los adultos son menos vulnerables a los daños neurológicos que el plomo provoca en niños, pero niveles de plomo en sangre superiores a 300 $\mu\text{g/L}$ también requieren evaluación.

Tratamiento.

El tratamiento de la toxicidad por plomo incluye agentes quelantes como penicilamina, Ca-ácido etilendiaminotetraacético (Ca-EDTA), y 2,3-dimercaptopropanol. El ácido dimercaptosuccínico (Succimer), [ref\(1586\)](#) que puede ser administrado por vía oral, parece tener menores efectos colaterales. La efectividad del tratamiento puede ser monitoreada determinando la excreción urinaria de plomo.

Método. [ref\(1587\)](#)

Espectrofotometría de absorción atómica con horno de grafito y corrector Zeeman es el método recomendado de análisis. La utilización en forma conjunta de fosfato diácido de amonio y nitrato de magnesio como modificadores de matriz resulta eficaz.

Mercurio (Hg) [refs\(1588\)](#)

Elemento de transición, peso atómico 201, del período 6 de la tabla periódica.

Bioquímica.

El mercurio está comúnmente presente en todos los tejidos analizados en seres humanos, aún en ausencia de una fuente de exposición identificada diferente de las amalgamas dentales. En tejido fresco, los niveles varían entre 0.1 a 0.5 $\mu\text{g/g}$. Las concentraciones más altas aparecen en piel, uñas, y pelo. Los riñones tienen un contenido mayor que el hígado, cerebro, tiroides, e hipófisis. En poblaciones expuestas a mercurio industrial, la pituitaria y la tiroides concentran mercurio en mayor medida que otros órganos. Los niveles elevados de mercurio en tejido están habitualmente asociados a una elevación de los niveles de selenio, con ambos elementos presentes en una relación molar 1:1.

El mercurio inorgánico es absorbido pobremente. Sin embargo, los alquil derivados de mercurio, especialmente el metil mercurio, formado por la acción de microorganismos en el sedimento de agua fresca o de agua de mar, se introduce en la cadena alimentaria y es absorbido aproximadamente en un 90 %. El vapor de mercurio es eficientemente absorbido por inhalación y cerca del 80 % del total inhalado es retenido por el organismo.

La fuente alimenticia de mercurio más común es el pescado, donde el elemento se encuentra como metil mercurio. [ref\(1589\)](#) En Estado Unidos y otros países, se han establecido límites de 0.4 a 1.0 mg mercurio/Kg de pescado. Los glóbulos rojos incorporan fácilmente metil mercurio, con una relación célula a plasma aproximada de 20:1. Las poblaciones que tienen un gran consumo de pescado pueden llegar a tener niveles de mercurio en sangre tan altos como 400 $\mu\text{g/L}$. El metil mercurio atraviesa la placenta, y el nivel en sangre de cordón umbilical correlaciona con el nivel materno, aunque ligeramente superior. [ref\(1590\)](#) La inhalación de vapor de mercurio produce un aumento menor en los glóbulos rojos que la observada por absorción de metil mercurio.

Importancia clínica.



La intoxicación por mercurio afecta el sistema nervioso central (SNC). Las anomalías del SNC asociadas a la intoxicación incluyen temblores, falta de coordinación, irritabilidad, trastornos del humor, y depresión.^{ref(1591)} La salivación, diarrea, estomatitis, y visión deteriorada acompañan a las anomalías neurológicas. El paso de metil mercurio a través de la placenta se asocia con aumento de las anomalías congénitas, retraso mental, parálisis cerebral, y mortalidad fetal. Todos estos síntomas se hicieron presentes después de un caso denominado el incidente de la Bahía de Minamata,^{ref(1592)} en el cual residuos industriales conteniendo mercurio fueron arrojados a la bahía. En la enfermedad de Minamata, se encontraron niveles elevados de metil mercurio en tejido fetal, particularmente en cerebro.

Se demostró que la concentración de mercurio en cabello correlaciona bien con los niveles sanguíneos, siendo aproximadamente 10 veces mayor en cabello. Las manifestaciones clínicas de la intoxicación aparecen a niveles de mercurio en sangre entera de 200 µg/L, que pueden resultar de una exposición cercana a 0.3 mg de mercurio por día bajo la forma de metil mercurio; ésta es una dosis equivalente a aproximadamente 4 µg de mercurio por Kg de peso corporal en adultos.

Método.^{ref(1593)}

El método preferido para el análisis del mercurio inorgánico es la espectrofotometría de absorción atómica con vapor frío. La predigestión de la muestra se requiere para convertir metil mercurio a mercurio inorgánico.

Niveles críticos en sangre y orina.^{ref(1594)}

Sangre: > 20 µg/L; 0.10 µmol/L.

Glóbulos rojos: > 40 µg/L; 0.20 µmol/L. *Orina:* 150 a 300 µg/L; 0.75 µmol/L.

Consideraciones para la Evaluación del Estado de Oligoelementos en el Organismo

El papel de los oligoelementos esenciales en biología se resume en la Tabla 38-3. El estado de la mayoría de los oligoelementos no puede ser evaluado a través de su concentración en sangre entera o plasma, el componente más accesible del organismo, lo cual constituye un problema para la atención del paciente. Debido a que no es posible especificar un umbral en plasma o suero para zinc, cobre, selenio, cromo, o manganeso, por debajo del cual la suplementación está indicada de cada elemento, se deben considerar otros parámetros bioquímicos concomitantemente para la evaluación nutricional de los metales traza. Éstos incluyen la disponibilidad en la dieta, condiciones existentes que involucren la redistribución dentro del organismo, desórdenes genéticos, regulación hormonal en el caso del yodo, y el estado funcional de los órganos excretores. Un importante hallazgo diagnóstico es la presencia de síntomas y signos clínicos normalmente asociados a la deficiencia de oligometales. Por ejemplo, un nivel de zinc en plasma menor de 500 µg/L asociado con lesiones dermatológicas, particularmente en niños en edad de crecimiento, sugiere una severa y aguda deficiencia de zinc. Será necesario investigar si la deficiencia proviene de una insuficiente ingesta en la dieta, o de una mala absorción de zinc como ocurre en la enfermedad



genética conocida como acrodermatitis enteropática. En casos de trauma, como quemaduras, un nivel similarmente bajo de zinc en plasma indica la redistribución del elemento, y es errónea la necesidad de su suplementación.

La principal ruta de excreción del zinc endógeno habitualmente es el tracto gastrointestinal, con una importante contribución de las secreciones pancreáticas y biliares. La absorción intestinal de oligoelementos puede ser reducida por competencia entre zinc, hierro, cobre, manganeso, y otros minerales divalentes presentes en la dieta. Los metales traza también pueden estar disminuidos en dietas con alto contenido de fibras, debido a que los metales se unen a los fitatos.

Aunque los niveles muy bajos de cobre plasmático, del orden de 300 µg/L, y ceruloplasmina (que une 60 % a 95 % del cobre) son indicativos de una franca deficiencia de cobre, el nivel plasmático generalmente no es un buen indicador del estado del cobre. Por ello, las pruebas funcionales, como la respuesta a un desafío antigénico de zinc y la medición de una enzima que requiera cobre, como la superóxido dismutasa o la citocromo oxidasa, son consideradas de utilidad en la evaluación del estado de estos metales en el organismo. En el caso del selenio, el nivel en suero es un indicador aceptable de la absorción reciente del mismo.

El estado del cromo es mejor evaluado por la capacidad del paciente para metabolizar glucosa. La excreción urinaria de glucosa puede ser monitoreada para este propósito. Las dificultades para lograr una medición exacta, libre de contaminación, de los niveles extremadamente bajos de cromo en suero u orina, resta importancia al valor de las determinaciones directas de cromo para establecer el estado este elemento en el organismo.

Las deficiencias de oligoelementos observadas en pacientes recibiendo nutrición parenteral total o alimentación entera, son raras hoy en la actualidad, pero debe asegurarse la suplementación adecuada en este grupo de pacientes, especialmente en aquellos tratamientos de larga duración. Si las determinaciones periódicas de zinc, cobre, selenio o manganeso, revelan una disminución en los niveles plasmáticos de estos elementos cuando la condición del paciente es estable, debe ser investigada la posibilidad de una deficiencia.

La identificación de los parámetros bioquímicos que pueden ser determinados para indicar el estado de los oligoelementos en el organismo, todavía es una tarea pendiente. El desafío es encontrar pruebas funcionales apropiadas o ensayos que midan la actividad de una enzima que tenga un requerimiento específico por un oligoelemento particular, y que además, sean convenientes para formar parte de los exámenes de rutina de un laboratorio de análisis clínicos.

Referencias

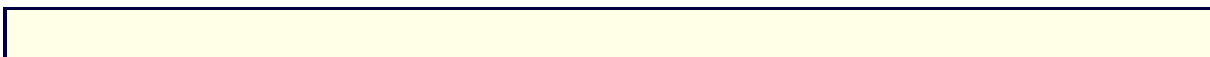
Classificación de oligoelementos

1. *Recommended Dietary Allowances*, ed 10, Subcommittee on the Tenth Edition of the RDA's Food and Nutrition Board, Commission on Life Sciences, National Research Council, National Academy Press, Washington, D.C., 1989, p 284.

Oligoelementos esenciales

Cromo

2. Anderson RA: Chromium. In Wertz W, editor: *Trace elements in human and animal nutrition*, ed 5, New



- York, 1987, Academic Press, vol 1.
3. Anderson RA, Polansky MM, Bryden NA, et al: Chromium supplementation of human subjects: effect on glucose, insulin, and lipid variables, *Metabolism* 32:894-899, 1983.
 4. Okada S, Tsukada H, Ohba HJ: Enhancement of nucleolar RNA synthesis by chromium (III) in regenerating rat liver, *J Inorg Biochem* 21:113, 1984.
 5. Jeejeebhoy KN, Chu RC, Marliss EK, et al: Chromium depletion: glucose intolerance and neuropathy reversed by chromium supplementation in a patient receiving long-term total parenteral nutrition, *Am J Clin Nutr* 30:531-538, 1977.
 6. Fishbein L: Perspectives of analysis of carcinogenic and mutagenic metals in biological samples, *Int J Environ Anal* 28:21-69, 1988.
 7. Veillon C, Patterson KY, Bryden NA: Determination of chromium in human serum by electrothermal atomic absorption spectrometry, *Anal Chim Acta* 164:67-76, 1984.
 8. Veillon C, Patterson KY, Bryden NA: Chromium in urine as measured by atomic absorption spectrometry, *Clin Chem* 28:2309-2311, 1982.

Cobre

9. Mason K: A conspectus of research on copper metabolism and requirements of man, *J Nutr* 109:1979-2066, 1979.
10. O'Dell BI: Copper. In Brown ML, editor: *Present knowledge in nutrition*, ed 6, Washington, D.C., 1990, International Life Sciences Institute, Nutrition Foundation.
11. Reiser S, Smith JC, Mertz W, et al: Indices of copper status in humans consuming a typical American diet containing either fructose or starch, *Am J Clin Nutr* 42:242-251, 1985.
12. Klevay LM, Inman L, Johnson LK, et al: Increased cholesterol in plasma in a young man during experimental copper depletion, *Metabolism* 33:1112-1118, 1984.
13. Danks DM, Campbell PE, Stevens BJ, et al: Menkes' kinky hair syndrome: an inherited defect in copper absorption with widespread effects, *Pediatrics* 50:188-201, 1972.
14. Brewer GJ, Hill GM, Dick RD, et al: Treatment of Wilson's disease with zinc. III: Prevention of reaccumulation of hepatic copper, *J Lab Clin Med* 109:526-531, 1987.
15. Milne DB, Johnson PE: Assessment of copper status: effect of age and gender on reference ranges in healthy adults, *Clin Chem* 39:883-887, 1993.
16. Alcock NW: Copper. In Pesce AJ, Kaplan LA, editors: *Methods in clinical chemistry*, St. Louis, 1987, Mosby.

Flúor

17. Krishnamachari KAVR: Fluorine. In Mertz W, editor: *Trace elements in human and animal nutrition*, ed 5, New York, 1987, Academic Press, vol 1.
18. Department of Health and Human Services, Public Health Service: *Review of fluoride benefits and risks*, report of ad hoc subcommittee on fluoride of the committee to coordinate environmental health and related programs, Washington, D.C., 1991, US Government Printing Office.
19. Riggs BL, Seeman E, Hodgson SF, et al: Effect of fluoride/calcium regimen on vertebral fracture occurrence in postmenopausal osteoporosis: comparison with conventional therapy, *N Engl J Med* 306:446-450, 1982.
20. Riggs BL, Hodgson SF, O'Fallon WM, et al: Effect of fluoride treatment on the fracture rate in postmenopausal women with osteoporosis, *N Engl J Med* 322:802-809, 1994.
21. Blancke RV, Decker WJ: Analysis of toxic substances: determination of fluoride in plasma and urine by ion specific potentiometry. In Tietz NW, editor: *Textbook of clinical chemistry*, New York, 1986, Saunders.

Yodo

1568



22. Hetzel BS, Maberly GF: Iodine. In Mertz W, editor: *Trace elements in human and animal nutrition*, ed 5, New York, 1986, Academic Press, vol 2.
23. Clugston GA, Hetzel BS: Iodine. In Shils ME, Olsen JA, Shike M, editors: *Modern nutrition in health and disease*, ed 8, Philadelphia, 1993, Lea & Febiger.
24. Larson PR, Alexander NM, Chopra IJ, et al: Revised nomenclature for tests of thyroid hormones and thyroid related proteins in serum, *J Clin Endocrinol Metab* 64:1089-1094, 1987.

Manganese

25. Keen CL, Zidenberg-Cherr S: Manganese. In Brown ML, editor: *Newer knowledge in nutrition*, ed 6, Washington, D.C., 1990, International Life Sciences Institute, Nutrition Foundation.
26. Hurley LS, Keen CL: Manganese. In Mertz W, editor: *Trace elements in human and animal nutrition*, ed 5, New York, 1987, Academic Press, vol 1.
27. Doisy EA Jr: Effect of a deficiency in manganese upon plasma levels of clotting proteins in man. In Hoekstra WG, Suttie HE, Ganther HE, Mertz W, editors: *Trace elements in animals*, ed 2, Baltimore, 1974, University Park Press.
28. Cotzias GC, Miller ST, Papavasiliou PS, Tang LC: Interactions between manganese and brain dopamine, *Med Clin North Am* 60:729-738, 1976.
29. *Techniques for graphite furnace atomic absorption spectrophotometry*, Norwalk, Conn., 1985, Perkin-Elmer Corp, p 189.

Molibdeno

30. Nielsen FH: Ultratrace minerals. In Shils ME, Olsen JA, Shike M, editors: *Modern nutrition in health and disease*, ed 8, Philadelphia, 1993, Lea & Febiger.
31. Mills CF, Davis GK: Molybdenum. In Mertz W, editor: *Trace elements in humans and animals*, ed 5, New York, 1987, Academic Press, vol 1.
32. Abumrad NN, Schneider AJ, Steel D, Rogers LS: Amino acid intolerance during prolonged TPN reversed by molybdate therapy, *Am J Clin Nutr* 34:2551-2559, 1981.
33. Koval'skii UV, Iarovaia, GA, Shmavonian DM: [Modification of human and animal purine metabolism in conditions of various molybdenum bio-geochemical areas], *Zh Obshch Biol* 22:179-181, 1961.
34. International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC): Determination of molybdenum in biological materials, *Pure Appl Chem* 63:1627-1630, 1991.

Selenio

35. Lockitch G: Selenium: clinical significance and analytical concepts, *Crit Rev Clin Lab Sci* 27:483-541, 1989.
36. Lavender OA, Burke RF: Selenium. In Shils ME, Olsen JA, Shike M, editors: *Modern nutrition in health and disease*, ed 8, Philadelphia, 1993, Lea & Febiger.
37. Robinson MF: Selenium in human nutrition in New Zealand, *Nutr Rev* 47:99-107, 1989.
38. Ip C: The chemopreventive role of selenium in carcinogenesis, *J Am Coll Toxicol* 5:7-20, 1986.
39. Ip C, Ganther HE: Activity of methylated forms of selenium in cancer prevention, *Cancer Res* 50:1206-1211, 1990.
40. Ip C, Hayes C, Budnick RM, Ganther HE: Chemical form of selenium, critical metabolites and cancer prevention, *Cancer Res* 51:595-600, 1991.
41. Lane HW, Lotspeich CA, Moore CA, et al: The effect of selenium supplementation on selenium status of patients receiving chronic total parenteral nutrition, *JPEN* 11:117-120, 1987.
42. Keshan Disease Research Group: *Chin Med J* 92:477-482, 1979.
43. McLaren CS: Clinical manifestations of human vitamin and mineral disorders. In Shils ME, Olsen JA, Shike M, editors: *Modern nutrition in health and disease*, ed 8, Philadelphia, 1993, Lea & Febiger.



44. Jacobson BE, Lockitch G: Direct determination of selenium in serum by graphite furnace atomic absorption spectrometry with deuterium background correction and a reduced palladium modifier: age specific reference ranges, *Clin Chem* 34:709-714, 1988.

Zinc

45. Hambidge KM, Krebs NF: Zinc. In Mertz W, editor: *Trace elements in humans and animals*, ed 5, New York, 1986, Academic Press, vol 2.
46. Cousins RJ, Hempe JM: Zinc. In Brown ML, editor: *Present knowledge in nutrition*, ed 6, Washington, D.C., 1990, International Life Sciences Institute, Nutrition Foundation.
47. Prasad AS, Miale A Jr, Farid Z, et al: Zinc metabolism in patients with the syndrome of iron deficiency anemia, hepatosplenomegaly, dwarfism, and hypogonadism, *J Lab Clin Med* 1:537-549, 1963.
48. Prasad AS: Discovery and importance of zinc in human nutrition, *Fed Proc* 43:2829-2834, 1984.
49. Moynahan EJ, Barnes PM: Zinc deficiency and a synthetic diet for lactose intolerance, *Lancet* 1:676-677, 1973.
50. Yokoi K, Alcock NW, Sandstead HH: Iron and zinc nutriture of premenopausal women: associations of diet with serum ferritin and plasma zinc disappearance and of serum ferritin with plasma zinc and plasma zinc disappearance, *J Lab Clin Med* 124: 852-861, 1994.
51. Sandstead HH: Zinc deficiency: a public health problem, *Am J Dis Child* 145:853-859, 1991.
52. Smith JC Jr, Butrimovitz GP, Purdy WC: Direct measurement of zinc in plasma by atomic absorption spectroscopy, *Clin Chem* 25:1487-1491, 1979.

Oligoelementos metálicos tóxicos

Aluminio

53. Alfrey AC: Aluminum. In Mertz W, editor: *Trace elements in human and animal nutrition*, ed 5, New York, 1986, Academic Press, vol 2.
54. Ott SM, Malong NA, Klein GL, et al: Aluminum is associated with low bone formation in patients receiving chronic parenteral nutrition, *Ann Intern Med* 98:910-914, 1983.
55. Sedman AB, Klein GL, Merritt RJ, et al: Evidence of aluminum loading in infants receiving intravenous therapy, *N Engl J Med* 312:1337-1343, 1985.
56. Klein GL, Alfrey AC, Miller AL, et al: Aluminum loading during total parenteral nutrition, *Am J Clin Nutr* 35:1425-1429, 1982.
57. Koo WWK, Kaplan LA, Horn J, et al: Aluminum in parenteral nutrition solutions-sources and possible alternatives, *JPEN* 10:591-595, 1986.
58. Klein GL, Alfrey AC, Shike M, et al: Parent drug products containing aluminum as an ingredient or a contaminant: response to FDA notice of intent, *Am J Clin Nutr* 53:399-402, 1991.
59. Alcock NW, Goeger MP: *Determination of aluminum with Zeeman graphite furnace atomic absorption spectrophotometry*. (In press.)

Arsenico

60. Anke M: Arsenic. In Mertz W, editor: *Trace elements in human and animal nutrition*, ed 5, New York, 1986, Academic Press, vol 2.
61. Smith HS: *J Forensic Sci Soc* 7:97-102, 1967.
62. Diplock AT, Mehlert A: Arsenic. In Anke M, Schneider HJ, Bruckner C, editors: *Spurenelement-Symposium*, Geneva, 1980, Wiss Publisher, Friedrich-Schiller University, pp 75-81.
63. Tan GKH, Charbonneau SM, Bryce F, Sandi E: Excretion of a single oral dose of fish-arsenic in man, *Bull Envir Contam Toxicol* 28:669-673, 1982.
64. Peterson RG, Rumack BH: d-Penicillamine therapy of acute arsenic poisoning, *J Pediatr* 91:661-666, 1977.



65. Tadlock CH, Aposhian V: Protection of mice against lethal effects of sodium arsenite by 2,3-dimercapto-1-propane sulfonic acid and dimercaptosuccinic acid, *Biochem Biophys Res Comm* 94:501-507, 1980.
66. Levine WG, Goodman LS, Gilman A, editors: Heavy metals and heavy metal antagonists. In *Pharmacological basis of therapeutics*, ed 5, New York, 1975, MacMillan.

Cadmio

67. Kostial K: Cadmium. In Mertz W, editor: *Trace elements in human and animal nutrition*, ed 5, New York, 1986, Academic Press, vol 2.
68. Kjellstrom T: Exposure and accumulation of cadmium in populations from Japan, the United States, and Sweden, *Environ Health Perspect* 28:169-176, 1979.
69. Smith TJ, Temple AR, Reading JC, et al: Cadmium, lead, and copper blood levels in normal children, *Clin Toxicol* 9:75-87, 1976.
70. Kowal DE, Johnson DE, Kraemer DF, Pahren HR: Normal levels of cadmium in diet, urine, blood, and tissues of inhabitants of the United States, *J Toxicol Environ Health* 5:995-1014, 1979.
71. Nordberg M: Studies on metallothionein and cadmium, *Environ Res* 15:381-404, 1978.
72. Tohyama C, Shaikh ZA, Nogawa K, et al: Urinary metallothionein as a new index of renal dysfunction in "itai-itai" disease patients and other Japanese women environmentally exposed to cadmium, *Arch Toxicol* 50:159-166, 1982.
73. Klassen CD, Waalkes MP, Cantilena LR: Alteration of tissue disposition of cadmium by chelating agents, *Environ Health Perspect* 54:233-242, 1984.

Plomo

74. Centers for Disease Control and Prevention (CDC): *Preventing lead poisoning in young children-a statement by the CDC*, Atlanta, 1991, Department of Health and Human Services, Public Health Service.
75. Quarterman KA: Lead. In Mertz W, editor: *Trace elements in human and animal nutrition*, ed 5, New York, 1986, Academic Press, vol 2.
76. Piomelli S, Graziano J: Laboratory diagnosis of lead poisoning, *Pediatr Clin North Am* 27:843-853, 1980.
77. Mahaffey KR: Environmental lead toxicity: nutrition as a component of intervention, *Environ Health Perspect* 89:75-78, 1990.
78. Bellinger DC, Stiles KM, Needleman HL: Low level lead exposure, intelligence, and academic achievement: a long-term follow up study, *Pediatrics* 90:855-861, 1992.
79. Needleman HL: The current status of low level lead toxicity, *Neurotoxicology* 14:161-166, 1993.
80. Jorgensen FM: Succimer: the first approved oral lead chelator, *Am Fam Physician* 48:1496-1502, 1993.
81. Jacobsen BE, Lockich G, Quigley G: Improved sample preparation for accurate determination of low concentrations of lead in whole blood by graphite furnace analysis, *Clin Chem* 37:515-519, 1991.

Mercurio

82. Clarkson TW: Mercury. In Mertz W, editor: *Trace elements in human and animal nutrition*, ed 5, New York, 1987, Academic Press, vol 1.
83. Subaki T, Irukagama K: *Minamata disease: methyl mercury poisoning in Minamata and Niigata*, Japan, Amsterdam, 1977, Elsevier Scientific Publishing Co.
84. Choi BH: The effects of methyl mercury on the developing brain, *Prog Neurobiol* 32:447-470, 1989.
85. Swedish Expert Group: MeHg in fish: a toxicologic-epidemiologic level of risks report from an expert, *Nord Hyg Tidsk* (supp 4), pp 1-364, 1971.
86. Magos L, Clarkson TW: Atomic absorption determination total, inorganic and organic mercury in blood, *J Assoc Office Anal Chem* 55:966-971, 1972.



Tablas

Tabla 38-1. Cantidades recomendadas diarias en la dieta (CRD) establecidas para zinc, yodo y selenio. Para efectos comparativos se incluye la CRD del hierro.

Categoría:	<u>Lactantes</u>	
Edad (años) o condición:	0.1-0.5	0.5-1.0
Peso (kg):	6	9
Peso (lb):	13	20
Altura (cm):	60	71
Altura (pulg.):	24	28
Hierro (mg):	6	10
Zinc (mg):	5	5
Yodo (µg):	40	50
Selenio (µg):	10	15

Categoría:	<u>Niños</u>		
Edad (años) o condición:	1-3	4-6	7-10
Peso (kg):	13	20	28
Peso (lb):	29	44	62
Altura (cm):	90	112	132
Altura (pulg.):	35	44	52
Hierro (mg):	10	10	10
Zinc (mg):	10	10	10
Yodo (µg):	70	90	120
Selenio (µg):	20	20	30

Categoría:	<u>Varones</u>				
Edad (años) o condición:	11-14	15-18	19-24	25-50	51 +
Peso (kg):	45	66	72	79	77
Peso (lb):	99	145	169	174	170
Altura (cm):	157	176	177	176	173
Altura (pulg.):	62	69	70	70	68
Hierro (mg):	12	12	10	10	10
Zinc (mg):	15	15	15	15	15
Yodo (µg):	150	150	150	150	150
Selenio (µg):	40	50	70	70	70

Categoría:	<u>Mujeres</u>				
Edad (años) o condición:	11-14	15-18	19-24	25-50	51 +
Peso (kg):	46	55	58	63	65
Peso (lb):	101	120	128	138	143
Altura (cm):	157	163	164	163	160
Altura (pulg.):	62	64	65	64	63
Hierro (mg):	15	15	15	15	10
Zinc (mg):	12	12	12	12	12
Yodo (µg):	150	150	150	150	150
Selenio (µg):	45	50	55	55	55

Categoría:	<u>Embarazo</u>				
-------------------	------------------------	--	--	--	--



Edad (años) o condición:		
Peso (kg):		
Peso (lb):		
Altura (cm):		
Altura (pulg.):		
Hierro (mg):	30	
Zinc (mg):	15	
Yodo (µg):	175	
Selenio (µg):	65	
Categoría:		
<u>Mujeres en lactancia</u>		
Edad (años) o condición:	1 - 6 meses	6 - 12 meses
Peso (kg):		
Peso (lb):		
Altura (cm):		
Altura (pulg.):		
Hierro (mg):	15	15
Zinc (mg):	19	16
Yodo (µg):	200	200
Selenio (µg):	75	75
Fuente: <i>Recommended Dietary Allowances</i> , ed 10, National Research Council, Washington D.C., 1989, National Academy Press.		

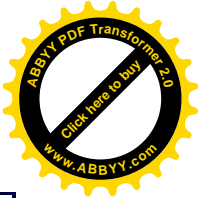
Tabla 38-2. Ingesta en la dieta diaria, estimada como inocua y adecuada, para algunos oligoelementos.

Categoría:		<u>Lactantes</u>			
Edad (años):		0-0.5	0.5-1		
Cobre (mg):	0.4-0.6	0.6-0.7			
Manganeso (mg):	0.3-0.6	0.6-1.0			
Flúor (mg):	0.1-0.5	0.2-1.0			
Cromo (µg):	10-40	20-60			
Molibdeno (µg):	15-30	20-40			
Categoría:		<u>Niños y Adolescentes</u>			
Edad (años):		1-3	4-6	7-10	11 +
Cobre (mg):	0.7-1.0	1.0-1.5	1.0-2.0	1.5-2.5	
Manganeso (mg):	1.0-1.5	1.5-2.0	2.0-3.0	2.0-5.0	
Flúor (mg):	0.5-1.5	1.0-2.5	1.5-2.5	1.5-2.5	
Cromo (µg):	20-80	30-120	50-200	50-200	
Molibdeno (µg):	25-50	30-75	50-150	75-250	
Categoría:		<u>Adultos</u>			
Edad (años):					
Cobre (mg):	1.5-3.0				
Manganeso (mg):	2.0-5.0				
Flúor (mg):	1.5-4.0				
Cromo (µg):	50-200				
Molibdeno (µg):	75-250				

1. Dado que existe poca información al respecto, los datos se presentan en la forma de rangos de ingesta recomendada en lugar de incorporarlos a la tabla anterior de las CDR.
 2. Como los niveles tóxicos para muchos oligoelementos pueden ser solamente algunas veces la ingesta normal, no deben superarse en forma habitual los niveles superiores presentados en esta tabla.
- Fuente: Recommended Dietary Allowances, ed 10, National Research Council, Washington D.C., 1989, National Academy Press.

Tabla 38-3. Función biológica de oligoelementos esenciales y anormalidades asociadas.

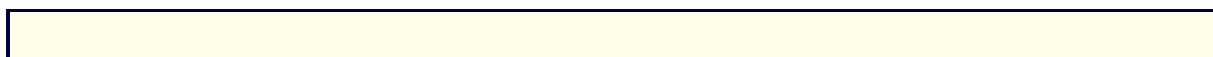
Elemento	Función biológica	Comentarios	Deficiencia/ Anormalidad/ Toxicidad
Cobalto	Componente de Vitamina B ₁₂	Sin otra función conocida	Deficiencia de vitamina B ₁₂ , anemia.
Cobre	Cofactor de enzimas oxidasas	90% a 95% del cobre plasmático unido a ceruloplasmina	Enfermedades hereditarias: Wilson, Menke
Cromo	Metabolismo de glucosa.	Potencia la acción de la insulina.	Intolerancia a la glucosa en deficiencia.
Flúor	Inhibe la caries dental; en forma terapéutica aumenta la calidad de los cristales de hidroxiapatita.	Habitualmente utilizado para suplementar el agua potable.	Ingesta excesiva causa fluorosis.
Hierro	Componente de hemo enzimas: hemoglobina, citocromos.	En plasma circula unido a transferrina; se almacena como ferritina.	Deficiencia: hipocromía, anemia microcítica.
Yodo	Componente de T ₃ y T ₄ .	Concentrado en tiroides; se agrega como suplemento a la sal omún.	La deficiencia de yodo todavía existe en algunas zonas geográficas.
Manganeso	Requerido para la	Componente de la	Deficiencia



	síntesis de glicoproteína y proteoglicano.	superóxido dismutasa mitocondrial.	desconocida en el hombre.
Molibdeno	Componente de la sulfito oxidasa y de la xantina oxidasa.	Esencial para la producción de ácido úrico.	Deficiencia en pacientes reportada que reciben nutrición parenteral total; incapacidad para metabolizar metionina.
Selenio			
Silicio	Participa en la calcificación en hueso.	Función pobremente definida en hueso, cartílago y tejido conectivo.	Deficiencia: dificultad en normal crecimiento en animales; la exposición en la industria puede provocar silicosis.
Zinc	Cofactor o componente de más de 200 metaloenzimas.	Involucrado en procesos metabólicos: síntesis proteica, funciones inmunológicas, crecimiento y desarrollo.	Deficiencia: fallas en crecimiento, hipogonadismo, mala cicatrización de heridas; enfermedades genéticas: acrodermatitis enteropática-malabsorción; toxicidad: vómitos, irritación gastrointestinal

Tabla 38-4. Intervalos de referencia para oligoelementos esenciales

Elemento	Tipo de muestra	Intervalo de Referencia		
		Concentración	U.I.	
Cr	S	0.12-2.1 µg/L	2.3-40.3	nmol/L
	GR	20-36 µg/L	384-692	nmol/L
	O	0.1-2.0 µg/L	1.9-38.4	nmol/día



Co	S	0.11-0.45	µg/L	1.9-7.6	nmol/L
	GR	16-46	µg/L	272-782	nmol/Kg
	O	1-2	µg/L	17-34	nmol/L
Vitamina B ₁₂ S		100-700	pg/mL	74-516	pmol/L
Cu	S	µg/dL		µmol/L	
	nacimiento - 6 meses	20-70		3.14-10.99	
	6 años	90-190		14.13-23.83	
	12 años	80-160		12.56-25.12	
	Adulto (hombre)	70-140		10.99-21.98	
	Adulto (mujer)	80-155		12.56-24.34	
	Embarazo a término	118-302		18.53-47.41	
	O	3-35	µg/día	0.047-0.55	µmol/día
F	P	0.01-0.2	µg/mL	0.5-10.5	µmol/L
	O	0.2-1.1	µg/mL	10.5-57.9	µmol/L
	Toxicidad				
I	O (cordón)	1.7-4.0	ng/dL	21.9-51.6	pmol/L
T ₄ libre	Recién nacido	2.6-6.3	ng/dL	33.5-81.3	pmol/L
	Adulto	0.8-2.3	ng/dL	10.3-31.0	pmol/L
T ₄ tota	IS adulto	5-12	µg/dL	65-155	µg/L
T ₃ libre (equilibrio de diálisis)	S (cordón)	15-391	pg/dL	0.2-6.0	pmol/L
	Niños y adultos	260-380	pg/dL	4.0-7.4	pmol/L
Radioinmu- noensayo	Adulto	208-674	pg/dL	3.2-104	pmol/L
T ₃ total	Adulto	100-200	ng/dL	1.54-3.08	pmol/L
Mn	S	0.5-1.5	µg/L	9-27	nmol/L
	B				
	O				
Mo	S	0.1-3.0	µg/L	1.0-31.3	nmol/L
Se	S	124.3-165	µg/L	1.57-2.09	µmol/L
	≥ 11 años	46-143	µg/L	0.58-1.81	µmol/L
	Adulto	85-145	µg/L	1.08-1.84	µmol/L
	Toxicidad	> 400	µg/L	> 5.06	µmol/L
	O	7-60	µg/L	0.09-0.78	µg/L
Zn	S	70-120	µg/dL	10.7-18.3	µmol/L
	O	300-500	µg/día	4.58-7.64	µmol

SE: sangre entera; U.I.:unidades internacionales standard; P:plasma; GR: glóbulos rojos;



O:orina; S:suero.

Tabla 38-5 Rangos de referencia aceptables y tóxicos para metales tóxicos.

Elemento	Tipo de muestra	Rango de referencia	
		Concentración	U.I. (unidades SI)
Al	Suero	< 4 µg/L	148 nmol/L
	Orina	0.120 mg/día	0.4-4 µmol/L
	Suero Ttoxicidad	Ver texto	
As	Sangre entera	2-62µg/L	26-826µmol/L
	Orina	5-50 µg/día	66-660 nmol/día
	Sangre entera	600-9300µg/L	8-125 µmol/L
	(toxicidad aguda - crónica)		
Cd	Sangre entera	< 5 µg/L	< 44.6 nmol/L
	Orina	< 6 µg/día	< 26 nmol/L
	Toxicidad	> 50 µg/L	> 446 nmol/L
Hg	Sangre entera	< 5 µg/L	< 24.9 nmol/L
	Sangre entera	5 - 15 µg/L	24.9-74.7 nmol/L
	dentistas		
	Orina	< 20 µg/día	< 99.5 nmol/L
	Sangre entera	> 50 µg/día	> 249 nmol /l
Pb	toxicidad		
	Pelo	< 1 µg/g	< 4.9 nmol/g
	Sangre entera	< 100 µg/L	< 480 nmol/L
	(niños)		

CAPÍTULO 39

39. Vitaminas

Marge A. Brewster

Vitaminas liposolubles

Vitamina A

Vitamina E

Vitamina K

Vitamina D



Vitaminas hidrosolubles

Acido ascórbico (Vitamina C)
Riboflavina
Piridoxina
Niacina
Tiamina
Biotina
Acido Pantoténico
Vitamina B₁₂
Acido Fólico
Carnitina

Vitaminas como antioxidantes

Métodos de Análisis

Acido ascórbico (Vitamina C)
Acido Fólico
Vitamina B₁₂

OBJETIVOS

- Definir vitamina
- Enumerar las vitaminas liposolubles, sus funciones, y las condiciones que resultan de una deficiencia.
- Enumerar las vitaminas hidrosolubles, sus funciones y las condiciones que resultan de una deficiencia.
- Describir las funciones de la vitamina B₁₂, y del ácido fólico, así como describir las condiciones de enfermedad que resultan de las deficiencias de estas vitaminas.

Términos clave

AGPI Ácidos grasos poliinsaturados

afonía Pérdida de la voz; movimientos para hablar pero sin sonido.

anemia megaloblástica Anemia en la que la médula ósea y las células sanguíneas son grandes y presentan núcleos multilobulados.

anemia perniciosa Anemia (ya no más considerada perniciosa) causada por anticuerpos que interfieren con la absorción de la vitamina B₁₂.

anorexia Pérdida del apetito.

antioxidante Una sustancia que evita la oxidación y que es, a menudo, rápidamente oxidada.

avidina Una glucoproteína de la clara de huevo cruda con fuerte afinidad por la biotina.

beriberi húmedo Deficiencia de tiamina que resulta en edema y en falla cardíaca.

beriberi seco Deficiencia de tiamina que provoca poco apetito, fatiga, y neuritis periférica

CDR Cantidades diarias recomendadas, cantidad de vitaminas recomendada como ingesta diaria necesaria para que una persona saludable logre satisfacer las necesidades fundamentales. Este lineamiento fue emitido por la Administración de Alimentos y



Medicamentos de los Estados Unidos y se conoce bajo las siglas RDA (Recommended Dietary Allowances).

carotenoides Compuestos estructuralmente similares al b caroteno (provitamina A) que existen naturalmente en los vegetales y en las frutas pigmentadas.

cianosis Color azul de la piel por falta de oxígeno.

coagulopatía Un trastorno de la coagulación.

colecistitis Presencia de piedras en la bilis.

creatinuria Excreción en exceso de creatina en la orina.

dipnea Respiración dificultosa y dolorosa.

deficiencia vitamínica subclínica Índices químicos del estado vitamínico que indican deficiencia, pero no hay síntoma clínico aparente.

enfermedad de Batten Una encefalopatía progresiva de la niñez con trastornos en el metabolismo de los ácidos grasos poliinsaturados.

equimosis Decoloraciones de la piel causadas por flujo de sangre a los tejidos.

escorbuto Deficiencia de ácido ascórbico caracterizado por encías hinchadas con pérdida de los dientes, lesiones en la piel, y dolor y debilidad en las extremidades inferiores.

escorbuto resurgente Síntomas de escorbuto que surgen de la supresión de una megadosis de ácido ascórbico.

esteatorrea Lípidos excesivos en las heces.

estomatitis angular Inflamación de la comisura de la boca.

fibrinólisis Proceso de disolución de los coágulos de fibrina.

flavinas Riboflavina, flavín adenín dinucleótido (FAD), y flavín mononucleótido (FMN).

fotofobia Sensibilidad anormal a la luz.

glositis Lengua lisa.

hidrolasas Enzimas que rompen las uniones éster mediante la adición de agua.

hiperuricemia Concentración aumentada de ácido úrico en suero.

isquemia Falta de suministro adecuado de sangre a los tejidos.

nucleótidos de piridina NAD, NADH, NADP y NADPH.

osteoblastos Células que forman el hueso.

osteoclastos Células que degradan el hueso.

ozono O₃ Aumenta en el aire en áreas con tráfico automovilístico intenso.

pancitopenia Disminución de las células sanguíneas y plaquetas.

parestesias Sensaciones anormales tales como el ardor, hormigueo, o tremor.

pelagra Deficiencia de niacina que resulta en diarrea, demencia y dermatitis.

pirexia Fiebre.

raquitismo Hipotonía muscular y deformidades esqueléticas en los niños.

síndrome de Wernicke-Korsakoff Alteraciones neurológicas y de comportamiento observadas en algunos pacientes con deficiencia en tiamina.

SNC Sistema nervioso central.

tioéster Unión éster en la que participa el grupo –SH.

vitaminas Compuestos de bajo peso molecular necesarios para la actividad metabólica que deben ser proporcionados por la ingesta dietaria.

xantomatosis Presencia de depósitos amarillos en la piel.



Las vitaminas son un grupo de compuestos de bajo peso molecular con diversas funciones en los tejidos biológicos. Principalmente, ellas sirven como cofactores de numerosas reacciones enzimáticas. Sin estos cofactores se volverían inactivas un amplio rango de enzimas que juegan papeles críticos en el metabolismo celular. El término vitamina se deriva de evidencia previa de que uno de dichos compuestos, la tiamina, era una amina vital para la salud. Estos compuestos o sus precursores biológicos inactivos deben ser obtenidos, al menos parcialmente, de las fuentes de alimentos o, en algunos casos, de la síntesis bacteriana intestinal. Las insuficiencias en el aporte (que resultan de una dieta inadecuada o de una absorción intestinal inadecuada) se denominan *deficiencias vitamínicas*. Las anormalidades del metabolismo que requieren un suministro anormalmente alto de uno de estos cofactores pueden ser denominadas *insuficiencias vitamínicas*, o *dependencias vitamínicas*, dependiendo del nivel de suministro requerido para la función fisiológica. Las variabilidades en la expresión clínica de las anormalidades vitamínicas resultan de diferencias en la causa específica y en el grado y duración de la insuficiencia vitamínica. Los factores adicionales que contribuyen a esta variabilidad incluyen la constitución genética del individuo, la presencia simultánea de insuficiencias nutricionales múltiples, o las demandas metabólicas crecientes impuestas por condiciones tales como infección, embarazo o cáncer. Aún tenemos conocimiento limitado sobre los mecanismos de absorción, transporte, almacenamiento y metabolismo de las vitaminas en el ser humano, y tenemos mucho que aprender con relación a los efectos que las enfermedades, terapias y agentes exógenos ejercen en estos procesos.

Debido a la acción difundida de las vitaminas en los procesos metabólicos, los síntomas clínicos de las deficiencias vitamínicas son generalmente no específicos y vagos, a menudo retardando un diagnóstico específico. Esto es especialmente cierto en los primeros estadios de la deficiencia vitamínica o en los estados de deficiencias crónicas moderadas; también la deficiencia vitamínica puede complicarse por otros procesos simultáneos. Para diagnosticar una deficiencia vitamínica a menudo se requiere una combinación de la historia de la dieta, el examen físico, y las mediciones bioquímicas. Además, un ensayo terapéutico puede también ser necesario para un diagnóstico definitivo. Debido a que el metabolismo de las vitaminas es complejo e interactivo, el suplemento vitamínico sin los estudios adecuados puede conducir a otras deficiencias nutricionales, toxicidad, o un estado irreversible de deficiencia no tratada con síntomas enmascarados por una terapia inapropiada. En la Tabla 39-1 se encuentra una lista de las funciones de las vitaminas y de los síntomas comunes que se manifiestan como causa de estados de deficiencia y toxicidad.

La sospecha de una deficiencia dietética de una vitamina surge primeramente del conocimiento de las fuentes de la dieta y de las prácticas dietéticas capaces de proporcionar un suministro o una absorción inadecuadas. Las Cantidades Diarias Recomendadas (CDR) son definidas por la Cámara de Alimento y Nutrición (Food and Nutrition Board)^{ref(1595)}, como los niveles de ingesta de nutrientes esenciales considerados adecuados, sobre la base de conocimiento científico disponible, para lograr las necesidades nutricionales de prácticamente todas las “personas saludables.” Estos niveles se definen a partir de la información sobre los requerimientos de ingesta diaria necesarios para evitar síntomas de deficiencia y para mantener funciones específicas. Los valores de CDR son generalmente establecidos lo suficientemente altos como para poder lograr las necesidades del 97.5% de la población; esos valores son a veces más altos si el nutriente es absorbido pobremente o es utilizado insuficientemente.



Los índices bioquímicos del estado vitamínico se tornan anormales antes del desarrollo de cambios clínicos obvios, permitiendo así una detección de una deficiencia vitamínica en un estado subclínico o no clásico. La determinación química del estado vitamínico humano ha sido abordada de varias maneras:

1. Medición de los cofactores activos o precursores en los fluidos biológicos o en los eritrocitos.
2. Medición del(os) metabolito(s) urinario(s) de la vitamina.
3. Medición de una función bioquímica que requiera la vitamina (como la actividad enzimática) con y sin la adición *in vitro* del cofactor.
4. Medición de la excreción urinaria de la vitamina o del(os) metabolito(s) después de la administración de una cantidad de prueba de la vitamina.
5. Medición de los metabolitos urinarios de una sustancia, cuyo metabolismo necesita la vitamina, después de la administración de una cantidad de prueba de la sustancia.

Sin embargo, las concentraciones reducidas de una vitamina en el suero no siempre indican una deficiencia que interrumpa la función celular; por otro lado, los valores que se encuentren dentro del intervalo de referencia no siempre reflejan una función adecuada. La interpretación de los valores químicos debe realizarse con cuidado y con conocimiento de los factores fisiológicos y metodológicos que puedan confundir un diagnóstico. A menudo se aconseja realizar varias mediciones diferentes de un estado vitamínico.

La Tabla 39-2 representa una lista de datos bioquímicos que se encuentran generalmente asociados a los síntomas clásicos de deficiencia. Estos valores están, por supuesto, de alguna manera afectados por la edad del paciente y por la metodología de laboratorio. Se proporciona una bibliografía de los artículos sobre metodología y funciones vitamínicas.

Vitaminas Liposolubles

Debido a que las vitaminas liposolubles (A, E, K y D) son absorbidas como parte del complejo quilomicroónico (ver capítulo 33), su absorción depende de la presencia de secreciones biliares y pancreáticas adecuadas así como también de la mucosa intestinal sana. Por lo tanto, los estadios de mala absorción crónicos se encuentran a menudo asociados con una deficiencia de una o más de estas vitaminas (ver capítulos 29 y 30). Los estados de mala absorción incluyen enfermedad del tracto biliar, enfermedad pancreática, fístula y obstrucción del intestino delgado, y enfermedad alcohólica hepática (ver capítulo 34). La deficiencia de esta clase de vitaminas generalmente se desarrolla lentamente a medida que van disminuyendo las reservas de las mismas. La vitamina A, puede ser almacenada en las células del parénquima hepático durante un año o más; y la vitamina E puede almacenarse en el tejido adiposo durante varios meses. Paradójicamente, aunque son liposolubles, las vitaminas K y D parecen almacenarse solamente durante días o semanas.

Vitamina A



Por primera vez descrita en 1909 y se encontró, en 1925, que prevenía la ceguera, ahora se conoce que la vitamina A está compuesta de tres formas biológicamente activas: retinol, retinal y ácido retinoico. Cada uno de estos tres compuestos principales de la vitamina A contiene un grupo trimetilciclohexenil y una cadena de polieno de configuración total en trans con cuatro dobles enlaces (Fig. 39-1). Estos compuestos derivan directamente de las fuentes de la dieta, principalmente como retinil ésteres, o a partir del metabolismo de los carotenoides de la dieta (provitamina A), principalmente el b-caroteno. Las principales fuentes de la dieta para estos compuestos incluyen los productos animales (vitamina A), así como las frutas y los vegetales pigmentados (carotenoides). Todos estos compuestos son soluble en solventes orgánicos, siendo el ácido retinoico más polar que el resto. La oxidación del retinol o del retinal por acción de las células periféricas es irreversible; por consiguiente ni el ácido retinoico ni el retinal son metabólicamente convertidos a retinol.

Metabolismo

Las enzimas de la mucosa del intestino delgado convierten el β -caroteno y el retinal de la dieta a la forma predominante de la vitamina A, el retinol (Fig. 39-2). Los retinil ésteres de los productos animales de la dieta son convertidos a retinol por las hidrolasas pancreáticas y de la mucosa (esterasas de la vitamina A). Una vez que el retinol se encuentra en la célula de la mucosa, es reesterificado, formando retinil ésteres (principalmente retinil palmitato) y transportado por los quilomicrones de la linfa a la circulación sistémica. Después de que los quilomicrones liberan sus triglicéridos al tejido adiposo, los retinil ésteres son transportados al hígado donde son almacenados en los hepatocitos asociados con gotas lipídicas. Debido a que el ácido retinoico es más polar, no requiere de este tipo de ruta de transporte lipoproteica, por lo que es directamente absorbido por la circulación porta. Sin embargo, esta forma no es almacenada en el hígado pero es excretada a través de la bilis como un conjugado glucorónico.

Cuando las demandas corporales requieren movilizar la vitamina A hepática, el retinil palmitato almacenado es hidrolizado y el retinol libre se combina con la proteína fijadora de retinol (PFR), ampliamente conocida por sus siglas en inglés RBP (Retinol-Binding Protein). El PFR-retinol es luego secretado a la circulación, donde se acompleja con la prealbúmina. Este complejo grande circula luego a los tejidos periféricos que tienen sitios de receptor específicos para el PFR, y el retinol es transferido intracelularmente a otra proteína de unión específica denominada proteína fijadora de retinol citosólico (PFRC). El complejo PFRC-retinol probablemente transporta el retinol a su sitio funcional dentro de la célula. El metabolismo del retinol se muestra en la Fig. 39-2.

Función (ver Tabla 39-1)

La única función fisiológica claramente definida para el retinol es su participación en la visión. En las células bastoncillos del ojo, el retinol es oxidado a retinal, el cual al acomplejarse con la opsina, forma rodopsina, permitiendo una visión de contraste. En los estados de deficiencia de vitamina A, las células epiteliales (células de las capas externas de la piel, y células a lo largo de los tractos gastrointestinal, respiratorio y urogenital) se vuelven secas y queratinizadas. De esta manera, la vitamina A puede ayudar en el mantenimiento de las células epiteliales, las cuales brindan protección contra los organismos infecciosos. Se sabe que el ácido retinoico, un componente menor de la vitamina A, tiene acción en el crecimiento



y en el mantenimiento del epitelio pero no en la visión ni en la reproducción.

Signos de deficiencia clínicos y químicos

Los signos clínicos de deficiencia de vitamina A pueden dividirse en signos tempranos y tardíos (ver Tabla 39-1). El signo químico de deficiencia es la reducción de vitamina A en el plasma. Generalmente los valores de retinol por debajo de 0.1 mg/L están asociados con síntomas clínicos, mientras que los valores por encima de 0.2 mg/L no lo están. [refs\(1596\)](#) Los valores por debajo de 0.29 mg/L pueden ser inadecuados para los pos-adolescentes. La vitamina A por sí sola no es excretada en la orina humana. Aunque se excretan muchos metabolitos, ellos no parecen reflejar el estado tisular de la vitamina A. Un método relativamente nuevo para la determinación del estado de la vitamina A es la prueba de dosis respuesta relativa (DRR) y una versión modificada de la misma (DRRM); estas pruebas miden el aumento del retinol plasmático después de la administración de retinil palmitato o de dehidroretinol. Otra medida funcional del estado de la vitamina A involucra la evaluación de la morfología de las células epiteliales conjuntivas, denominada como citología de impresión conjuntiva (CIC). [ref\(1597\)](#)

Fisiopatología

Debido a que el retinol y el FPR son secretados por el hígado como un complejo 1:1, las concentraciones plasmáticas bajas de ambos compuestos son consideradas como deficiencia de vitamina A. Una concentración adecuada de retinol plasmático indica generalmente suficiencia alimenticia y tisular, pero concentraciones bajas no siempre indican deficiencia alimentaria. Los factores que reducen la síntesis hepática de FPR, o la secreción del complejo retinol-FPR, disminuyen las concentraciones plasmáticas de retinol y de FPR, aun cuando la ingesta alimenticia y el almacenamiento de retinol hepático sean los adecuados. Estos estados son reconocidos principalmente por la ausencia de un aumento del retinol plasmático después de una terapia oral con vitamina A e incluye malnutrición calórica por proteína, enfermedad hepática, deficiencia de zinc, y fibrosis quística.

Las condiciones fisiopatológicas que pueden resultar en un aumento de retinol y FPR incluyen la enfermedad renal crónica y el uso oral de anticonceptivos.

Toxicidad y usos terapéuticos

Los retinoides han sido usados terapéuticamente para prevenir el daño de la función auditiva y para tratar una variedad de trastornos de la piel. Un retinoide, el ácido 13-cis retinoico (Accutane) se ha tornado la terapia de elección para varias formas de acné. El Accutane, sin embargo, debe usarse con gran precaución porque grandes dosis de retinoide tomadas durante el embarazo pueden resultar en malformaciones congénitas. El papel anticarcinogénico de retinoides en altas dosis ya ha sido bien establecida en los animales. Se ha visto una correlación inversa entre la vitamina A sérica y la incidencia de cáncer de pulmón, indicando que la vitamina A puede tener un papel en la prevención de este cáncer. Las evaluaciones de retinol y FPR pueden ser útiles en la selección de quienes se encuentran en alto riesgo para cáncer de pulmón. Tal correlación inversa ha sido también encontrada entre los hombres que posteriormente desarrollan cáncer de próstata. Los ensayos clínicos para evaluar la actividad antitumoral de la vitamina A y de los compuestos relacionado están en



progreso.[ref\(1598\)](#) Al final de este capítulo se discute sobre la acción de la vitamina A y de los carotenos como antioxidantes.

La deficiencia de vitamina A frecuentemente está asociada con los desórdenes en la absorción de las grasas.[refs\(1599\)](#) Los niños prematuros nacen con niveles bajos de FPR y de retinol séricos, así como con almacenamientos reducidos de retinol hepático. Los recién nacidos enfermos son, por ello, tratados con vitamina A como una medida preventiva. Con un exceso de vitamina A, la capacidad de almacenamiento del hígado puede excederse, apareciendo en la circulación retinol libre y retinil ésteres en las lipoproteínas. En este punto, la concentración de retinil éster en el plasma se torna alta. Una prueba de mala absorción de la grasa involucra la administración de una dosis oral de vitamina A. Con una adecuada absorción, el retinol plasmático permanece invariable y el retinil palmitato se eleva dentro de las 4 horas.

Vitamina E

Un factor de los aceites vegetales que reestablecía la fertilidad en las ratas fue aislado al comienzo de la década de los años 20 y denominado como vitamina E; más tarde se le dio el nombre genérico de *tocoferol* y se vio que incluía varios isómeros biológicamente activos (Fig. 39-3). El término tocoferol es de origen griego y significa “aceite que confiere fuerza en el nacimiento de un niño” pero aun se cuestiona la función de estos compuestos en la fertilidad. El α -tocoferol es el isómero predominante en el plasma y es el isómero más potente en los ensayos biológicos corrientes. Se desconoce si los isómeros del tocoferol tienen efectos fisiológicos separados.

Las fuentes de tocoferol de la dieta incluyen los aceites vegetales, los vegetales de hojas frescas, la yema de huevo, legumbres, cacahuates, y margarina. Las dietas con probable deficiencia de vitamina E son aquellas con bajo contenido en aceites vegetales, o vegetales de hojas verdes o aquellas dietas con alto contenido en grasas insaturadas.

Metabolismo

La absorción, el transporte, el almacenamiento, y el metabolismo de los tocoferoles están sólo parcialmente comprendidos. Se cree que la absorción está asociada con la absorción intestinal de los lípidos. Aproximadamente el 40% del tocoferol ingerido es absorbido; el porcentaje es afectado por la cantidad y por el grado de insaturación de la grasa de la dieta así como por el tipo de isómero. El requerimiento fisiológico de vitamina E aumenta con el aumento de los ácidos grasos poliinsaturados, AGPI (también conocidos como PUFA; Polyunsaturated Fatty Acids, por sus iniciales en inglés), en la dieta. La vitamina E absorbida se encuentra primero asociada con los quilomicrones circulantes y con las lipoproteínas de muy baja densidad, VLDL (llamadas también VLDL por sus siglas en inglés; Very Low Density Lipoproteins), y algo se transfiere al tejido adiposo durante la hidrólisis de los triglicéridos. La vitamina E que queda en los quilomicrones remanentes es transportada al hígado. El α -tocoferol es secretado de nuevo como un componente de las VLDL

provenientes del hígado (o quizás de las proteínas de alta densidad).[ref\(1600\)](#) La vitamina E se encuentra predominantemente en el tejido adiposo, aunque el acetato de α -tocoferol de la dieta se refleja por la concentración aumentada en todos los tejidos animales, incluyendo el plasma, los eritrocitos, y las plaquetas. Se ha descrito una proteína fijadora de α -tocoferol (PFT) en el



citosol de la célula hepática.[ref\(1601\)](#)

Función.

La vitamina E funciona como un antioxidante protegiendo a los lípidos insaturados de la peroxidación (ruptura de los ácidos grasos en los sitios insaturados por la adición del oxígeno al doble enlace y la formación de radicales libres).[ref\(1602\)](#) El papel de la vitamina E en la protección de la membrana del eritrocito a partir del estado oxidativo es actualmente la función más documentada de la vitamina E en la fisiología humana. Existen evidencias de funciones preventivas de la vitamina E en la fibroplasia retrolenticular, hemorragia intraventricular y mortalidad de niños pequeños prematuros.⁷ Actualmente existe suficiente evidencia de que la vitamina E juega un papel neurológico.[ref\(1603\)](#) y de que también puede participar en la prevención de la enfermedad cardiovascular.[ref\(1604\)](#) Al final de este capítulo se presenta una discusión mas detallada del papel antioxidante de la vitamina E.

Signos clínicos de deficiencia (ver Tabla 39-1)

El síntoma más importante de la deficiencia de vitamina E es la anemia hemolítica. Aunque la utilización de la vitamina E para tal fin es aun controvertida, a los recién nacidos prematuros generalmente se les suministra un suplemento de vitamina E para estabilizar sus glóbulos rojos y para evitar la anemia hemolítica. Los pacientes con estados resultantes de una mala absorción de grasa, especialmente con fibrosis quística y con abetalipoproteinemia, son sospechosos de presentar deficiencia en vitamina E; se ha reconocido que existe una relación entre la deficiencia de la vitamina E y la pérdida progresiva de función neurológica en los bebés y los niños con colestasis crónica.[ref\(1605\)](#) Se ha postulado una alteración en la proteína fijadora de tocoferol como una causa de la deficiencia de vitamina E cuando no existe mala absorción de lípidos.[ref\(1606\)](#)

Signos químicos de deficiencia

Las concentraciones plasmáticas de α -tocoferol por debajo de los 5mg/L están asociadas con una hemólisis eritrocitaria aumentada en presencia de peróxido de hidrógeno y por ello son denominadas “deficientes”.[refs\(1607\)](#) Existe una fuerte correlación entre el α -tocoferol plasmático y los lípidos plasmáticos, indicando que las concentraciones plasmáticas pueden interpretarse con relación a los niveles de lípidos plasmáticos; una concentración de 0.8 mg de α -tocoferol por gramo del total de los lípidos del plasma parece indicar niveles adecuados de vitamina E en los bebés. El aumento de los lípidos plasmáticos totales por encima de 15 g/L puede, aparentemente, desviar el α -tocoferol eritrocitario hacia el plasma, alterando potencialmente la susceptibilidad del eritrocito a pesar de las concentraciones plasmáticas “adecuadas” de α -tocoferol en los estados de hiperlipidemia.[refs\(1608\)](#) El aliento a etano ha sido medido como un marcador de deficiencia.

Fisiopatología

Actualmente está indicada principalmente la evaluación del estado de vitamina E en los recién nacidos, en personas con estados de mala absorción de grasa y en personas que reciben dietas sintéticas. La insuficiencia de la dieta rara vez causa deficiencia en vitamina E.

Se han encontrado valores elevados de vitamina E en el suero durante el embarazo y en pacientes con la enfermedad de Batten (una encefalopatía progresiva de la niñez con metabolismo alterado de los ácidos grasos poliinsaturados). Se han encontrado valores bajos de vitamina E en el suero en pacientes con ataques de epilepsia [refs\(1609\)](#) y en personas expuestas a dosis no sintomáticas de organofosfatos.⁵

Toxicidad

La toxicidad puede resultar de sobredosis voluntarias crónicas. Los bebés prematuros que reciben vitamina E suficiente para mantener los niveles séricos por encima de los 30mg/L tienen una incidencia aumentada a la sepsis y a la enterocolitis necrosante. Los pacientes que reciben dietas sintéticas deben ser continuamente evaluados para evitar toxicidad por vitamina E (ver Tabla 39-1).

Vitamina K

Los experimentos realizados en los años 1930 condujeron al descubrimiento del factor antihemorrágico denominado vitamina K (del alemán *Koagulationsvitamin*). Las investigaciones sobre su purificación revelaron varios compuestos que contenían quinona, con actividad antihemorrágica, y el término vitamina K es actualmente utilizado para referirse genéricamente a la menadiona y los derivados que exhiben dicha actividad. Existe un gran número de estos compuestos que están relacionados con los que se muestran en la Fig. 39-4 mediante el número y sustituyentes de las cadenas laterales isoprenoides y por el grado de saturación.

Las vitaminas K son inestables en condiciones ácidas o alcalinas y son rápidamente oxidadas. Las fuentes más importantes de la dieta son el repollo, coliflor, espinaca y otros vegetales de hojas verdes, cerdo, hígado, poroto de soja, y aceites vegetales. Se considera rara una deficiencia dietética sin complicaciones en niños y adultos saludables, pero un estudio reveló deficiencias en un gran porcentaje de individuos viejos, deficiencias que luego fueron corregidas por administración oral de la vitamina K. [ref\(1610\)](#)

Metabolismo

En los bebés la vitamina K es absorbida por el colon, donde la fuente mayor de esta vitamina es la síntesis bacteriana. Los niños mayores y los adultos absorben la vitamina K en el intestino delgado superior, en donde es insignificante la contribución de las bacterias intestinales. La absorción de la vitamina K en los intestinos es mediada por los quilomicrones, y los estados de mala absorción de vitamina K incluyen fibrosis quística, atresia biliar, colelitiasis, e ictericia obstructiva, a partir de anemias hemolíticas así como de desórdenes que conducen a un mal funcionamiento del intestino delgado superior. Se requieren generalmente alrededor de tres semanas para manifestar deficiencia por agotamiento del almacenamiento corporal.

Función

Primeramente fue demostrado que la vitamina K estaba involucrada en la síntesis de protrombina, luego se encontró que era requerida para la síntesis de otros factores activos de



coagulación (los factores VII, IX y X). En el hígado se lleva a cabo la γ -carboxilación de los residuos de ácido glutámico dependiente de vitamina K, que forma parte de proteínas precursoras inactivas.

Signos clínicos de deficiencia (ver Tabla 39-1)

La manifestación clínica de una deficiencia de vitamina K es la hemorragia como resultado de reducción de protrombina y de otros factores de coagulación.

Signos químicos de deficiencia

Por lo general, la medición directa de la vitamina K en la sangre no es efectuada en los adultos. La determinación del tiempo de protrombina (velocidad de coagulación después del agregado de tromboplastina y de calcio al plasma citrado) es un índice excelente de suficiencia de protrombina. Este tiempo es prolongado cuando existe deficiencia de vitamina K y también en las enfermedades hepáticas caracterizadas por una síntesis reducida de protrombina. La deficiencia de vitamina K también resulta en la prolongación del tiempo parcial de tromboplastina, aunque el tiempo de trombina se encuentra dentro del intervalo de referencia. El mejoramiento clínico de estos tiempos de coagulación se percibe dentro de unas pocas horas después del suministro de vitamina K. La medición inmunológica de la falta de carboxiprotrombina (proteína inducida por la ausencia de vitamina K: PIVKA II) es útil en la detección de deficiencia de vitamina K en los neonatos y parece tener una mayor sensibilidad que la que han tenido las pruebas de coagulación.[ref\(1611\)](#) El estado de vitamina K puede ser establecido por medidas de filoquinona y menaquinona en plasma o en tejido hepático mediante HPLC.

Fisiopatología

Los estados de mala absorción de vitamina K fueron descritos antes. La reducción de protrombina observada en pacientes con hígado graso alcohólico es corregida por administración de vitamina K, solamente si está asociada a malnutrición o a mala absorción. Paradójicamente, la administración de vitamina K a pacientes con mal funcionamiento hepático subclínico preexistente resulta, a menudo, en una prolongación de un tiempo de protrombina previamente normal. La acción de la vitamina K es antagonizada por anticoagulantes como la cumarina o la indandiona. El uso de anticonceptivos aumenta los niveles de protrombina y de factores VII, IX y X, reduciendo y aparentemente el requerimiento de vitamina K.

La infección gastrointestinal asociada con la diarrea, combinada con una terapia prolongada de antibióticos y fórmulas suplementarias de sustitutos de leche carentes de vitamina K, ha conducido a síntomas de hemorragia en bebés. El reconocimiento de esta combinación de causas de deficiencia de vitamina K ha llevado a la suplementación de fórmulas y de administración adicional de vitamina K cuando es necesario, por lo que dichos síntomas son raros.

Vitamina D

Desde 1822, es sabido que el raquitismo (hipotonía muscular y deformidades esqueléticas) podía curarse con aceite de hígado de bacalao. Este factor antirraquítico fue identificado como vitamina D hace un siglo e inmediatamente fue demostrada su existencia en múltiples formas. Estos compuestos antirraquíticos actualmente son denominados vitamina D.

La vitamina de aceite de pescado que existe naturalmente es el colecálciferol (Vitamina D₃); se produce en la piel a partir de activación ultravioleta del 7-dehidrocolesterol. Actualmente se sabe que la vitamina D₃ es una prohormona que es convertida en el hígado a 25-hidroxicolecalciferol (calcidiol), el cual posteriormente es hidroxilado en el riñón para formar la hormona 1,25-dihidroxicolecalciferol (calcitriol). El calciferol (vitamina D₂), que es la forma principal en la dieta (la forma utilizada en el fortalecimiento del alimento), es hidroxilado de igual manera (ver capítulo 28).

Las fuentes dietéticas más importantes incluyen comidas irradiadas y leche preparada comercialmente. Existen pequeñas cantidades en la manteca, yema de huevo, hígado, salmón, sardinas, y atún.

Las acciones fisiológicas, regulación y establecimiento de las formas hormonales de la vitamina D son discutidos en el capítulo 28. La concentración de 25-hidroxicolecalciferol en el suero refleja el estado global de vitamina D, ya que es un promedio de vitamina D de la dieta y de la inducida por la luz solar. La concentración de 1,25-dihidroxicolecalciferol en el suero es útil en las evaluaciones de los trastornos del metabolismo del calcio y de los huesos.[ref\(1612\)](#)

La deficiencia resulta en raquitismo (niños) o osteomalacia (adultos), correspondiendo ambos a formas de síntesis anormal de hueso. El exceso de ingesta dietética es común en los Estados Unidos, creando preocupación del papel de la hipervitaminosis D en el desarrollo de la aterosclerosis.[ref\(1613\)](#)

Vitaminas Hidrosolubles

Las nueve vitaminas hidrosolubles son absorbidas sin la participación de la absorción de grasa, y el exceso de vitamina a menudo es excretado en la orina. La tiamina es almacenada solamente por pocas semanas, y la mayor parte de las vitaminas del complejo B y el ácido ascórbico se almacenan por menos de 2 meses. El desarrollo de deficiencia puede, por lo tanto, ser bastante rápido. La vitamina B₁₂, a pesar de ser una vitamina hidrosoluble, se almacena en el hígado por varios años. Estas vitaminas hidrosolubles funcionan como coenzimas, y todas excepto el ácido ascórbico y la biotina pueden ser metabólicamente convertidas a formas activas.

Acido Ascórbico (vitamina C)

El conjunto de síntomas conocido como escorbuto (encías hinchadas con pérdida de dientes, lesiones en la piel y dolor y debilidad en las extremidades inferiores) fue descrito claramente durante las cruzadas y se tornó algo común cuando comenzaron las largas travesías de ultramar. En 1747, un cirujano naval experimentando con dietas para curar el escorbuto identificó la eficacia de las frutas cítricas. Este agente antiescorbútico, la vitamina C, fue aislado en 1932 y más tarde se denominó ácido ascórbico (por su efecto antiescorbútico). La estructura de esta vitamina hidrosoluble y su forma oxidada, dehidroascorbato, se muestra en la Fig. 39-5. Debido a su función eno-diol, el ascorbato es un compuesto reductor muy fuerte. Aunque las plantas y la mayor parte de los animales pueden sintetizar esta vitamina, los



humanos no pueden, y por ello es esencial su ingesta en la dieta.

La mayor parte de las fuentes de la dieta incluyen las frutas (especialmente los cítricos) y los vegetales (tomates, morrones verdes, repollo, vegetales verdes, papas). Debido a que el ascorbato es lábil al calor y al oxígeno, las comidas frescas y sin cocinar presentan alto contenido en ascorbato. La deficiencia en la dieta es altamente improbable en una persona que coma una vez al día frutas o vegetales frescos pero es común en los niños pequeños que reciben leche de vaca exclusivamente.

Metabolismo

El ascorbato es absorbido en el intestino delgado. Se encuentra ampliamente distribuido en los tejidos (la mayor parte concentrado en la corteza adrenal y en la pituitaria) y traspasa fácilmente la placenta. Se requieren de varios meses para agotar el almacenamiento normal del cuerpo antes de que aparezcan los síntomas del escorbuto. Las concentraciones en el fluido cefalorraquídeo (LCR) son mayores que las del plasma. El exceso de ascorbato, y un metabolito, el oxalato, son rápidamente eliminados en la orina. Generalmente el metabolismo del ascorbato es responsable de aproximadamente la mitad del oxalato urinario (Fig. 39-5).

Función

El ácido ascórbico es importante en la formación y en la estabilización de la colágena, ya que favorece la hidroxilación de la prolina y el entrecruzamiento de la lisina, y participa en la conversión de tirosina a catecolaminas (por la dopamina β -hidroxilasa). Además, existen evidencias que involucran al ascorbato en las reacciones de hidroxilación (incluyendo la conversión del colesterol en los ácidos biliares, el metabolismo de los compuestos orgánicos xenobióticos, y en la síntesis de carnitina y esteroides) y en la protección contra la peroxidación lipídica. Favorece la absorción del hierro en el intestino y puede estar involucrado en la síntesis del grupo hemo.[refs\(1614\)](#) El ácido ascórbico forma parte del metabolismo del ácido fólico, de los aminoácidos, de los nucleótidos cíclicos, y de la glucosa. También se le atribuye un papel en la función inmune.

Signos de deficiencia clínicos y químicos

Los signos clínicos de deficiencia de ácido ascórbico se encuentran enumerados en la Tabla 39-1. Los signos clínicos del escorbuto se han asociado con los valores del ascorbato sérico por debajo de 2.4 mg/L o con niveles de ascorbato sanguíneo total por debajo de 3mg/L. Los valores transitorios bajos, sin embargo, no reflejan necesariamente una deficiencia tisular. La ingesta mayor de ascorbato aumenta los niveles de ascorbato séricos a un máximo aproximado de 14 mg/L, punto en el cual el tiempo de depuración renal aumenta abruptamente. Se considera que el ascorbato leucocitario refleja de manera cercana las reservas tisulares, pero técnicamente es más difícil de determinar. Aunque la vitamina C del plasma se encuentra predominantemente en la forma del ácido ascórbico, los tipos celulares leucocitarios también contienen considerablemente ácido dehidroascórbico. Las diferentes vitaminas C que se almacenan en cada tipo celular leucocitario, la posibilidad de interconversiones artificiales de las formas de vitamina C, y las numerosas metodologías de ensayo han conducido a valores ampliamente divergentes para la leucocitosis.[refs\(1615\)](#) No se recomienda la medición del ascorbato urinario para establecer el estado vitamínico porque refleja la ingesta reciente y plantea numerosas dificultades analíticas. Los fármacos que se

1589



sabe aumentan la excreción urinaria del ascorbato incluyen la aspirina, aminopiridina, barbituratos, hidantoínas, y paraldehído. Ya se han descrito evaluaciones funcionales no confiables del estado de la vitamina C. Recientemente se han revisado las estrategias de evaluación y las fallas.[refs\(1616\)](#)

Fisiopatología

Los requerimientos de ácido ascórbico se encuentran aumentados en las enfermedades crónicas, durante el embarazo y durante el uso de anticonceptivos orales. La deficiencia ha sido observada en los niños que reciben leche de vaca sin suplementos, en lactantes cuyas madres tienen deficiencia. Existe controversia sobre si la tirosinemia transitoria observada en muchos pequeños es una condición inofensiva o una terapia que requiere de ascorbato para evitar el daño en el desarrollo mental. La importancia de la vitamina C como antioxidante se discute en la pág. 786.

Toxicidad y usos terapéuticos

La utilidad del ascorbato para prevenir los resfríos y el cáncer no ha sido científicamente determinada (excepto posiblemente para los cánceres gástrico y de esófago ya que evitan la formación de nitrosaminas)[ref\(1617\)](#) pero ha llevado a la práctica común de ingesta de megadosis de vitamina C. Aun cuando existe poca toxicidad de este ascorbato, la ingesta en exceso puede interferir con el metabolismo de la vitamina B₁₂ y con las acciones de medicamentos comunes (ácido aminosalicílico, antidepresivos tricíclicos y anticoagulantes). Una interrupción repentina de una ingesta de megadosis de vitamina C puede resultar en un resurgimiento del escorbuto.

Riboflavina

El pigmento amarillento fluorescente de la leche, los huevos, la levadura y el hígado descubierto en el siglo 19 (llamado *flavin* de la palabra latina para “amarillo”), la “enzima amarilla” encontrada en la levadura y el factor amarillo de crecimiento animal estable al calor cristalizado de la leche en la década de los 30, fueron finalmente reconocidos que están formados por la misma sustancia; una vitamina, la riboflavina, que consiste de un pigmento, la flavina, unida a un carbohidrato, el D-ribitol. Su estructura y la de sus dos formas activas de cofactor, la riboflavina 5' fosfato (flavin mononucleótido, FMN) y el flavin adenin dinucleótido (FAD) se muestran en la Fig. 39-6. El FAD, la más hidrosoluble de las tres flavinas, muestra fluorescencia anaranjada, mientras que las otras dos tienen fluorescencia amarillo verdosa. Las soluciones acuosas de las flavinas son estables al calor y a los agentes oxidantes, pero la riboflavina de la leche es reducida drásticamente cuando se expone a la luz solar.

Los alimentos que contienen mucha riboflavina incluyen la leche, el hígado, huevos, carne, y algunos vegetales de hojas verdes. Los organismos intestinales sintetizan riboflavina pero la localización distal de estas bacterias puede impedir la absorción.

Metabolismo

Los complejos proteicos dietéticos con FAD y FMN liberan estas flavinas con la proteólisis y la acidificación gástrica. Después de la defosforilación, son absorbidas en el intestino delgado proximal y refosforiladas; luego aparecen en la circulación débilmente unidas a la albúmina y a otras proteínas plasmáticas, incluyendo las proteínas ligadas específicamente

1590

a la riboflavina. La mayoría de las flavinas son tomadas rápidamente por el hígado y los riñones, pero aún se encuentran cantidades cuantificables en la mayor parte de los tejidos. Las tres formas de flavinas pueden ser interconvertidas enzimáticamente. El FAD es la forma tisular predominante. Pequeñas cantidades de flavina son excretadas en la bilis, las heces, en la transpiración y en la leche mamaria, mientras que la excreción de flavina urinaria es mayor. La flavina es excretada en la orina, en su mayor parte en forma de riboflavina libre; la cantidad excretada depende de los almacenamientos tisulares y de la cantidad ingerida. Solamente una pequeña cantidad de la riboflavina ingerida es metabolizada por el cuerpo. La riboflavina, mas no el FMN o el FAD, es la parte transferida del plasma al cerebro. Las flavinas sanguíneas están presentes principalmente en los eritrocitos y funcionan en las dos enzimas dependientes de FAD, la glutatión reductasa y la metamioglobina reductasa. El feto obtiene riboflavina libre del FAD eritrocitario materno a través de la placenta.

Función

Los sistemas enzimáticos flavoproteicos contienen FAD o FMN como grupos prostéticos. La mayor parte de las flavoproteínas catalizan la remoción ya sea de un ion hidruro o de un par de átomos de hidrógeno del sustrato. La riboflavina tiene funciones clave en las enzimas respiratorias como la D-aminoácido oxidasa, la piruvato deshidrogenasa, la xantino oxidasa, la glutatión reductasa, y la NADH deshidrogenasa. Además, las flavinas participan en el metabolismo del hierro, piridoxina, y folato; también intervienen en la protección contra la peroxidación, en el metabolismo de los xenobióticos y en la generación de superóxido por los granulocitos.[ref\(1618\)](#)

Signos clínicos y químicos de deficiencia

Los signos clínicos de deficiencia se encuentran descritos en la Tabla 39-1. Las concentraciones eritrocitarias de riboflavina, FMN y FAD son los índices más sensibles del estado de riboflavina de lo que son las mediciones de flavina en la orina o en el plasma, pero estos índices sanguíneos se alteran sólo en fases tardías de la deficiencia. Una estrategia funcional para evaluar el estado de riboflavina involucra la medición del aumento de la actividad de la glutatión reductasa eritrocitaria (GRE) después la adición *in vitro* de FAD (índice GRE). Este índice GRE alcanza inmediatamente su valor máximo constante y ya no aumenta a medida que progresa la deficiencia. En los sujetos deficientes en glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6-PD), el índice GRE se confunde debido a que el GRE no pierde su coenzima aun en un estado de deficiencia severa de riboflavina.[ref\(1619\)](#)

Fisiopatología

La arriboflavinosis es detectada más comúnmente cuando existe una ingesta inadecuada como resultado de la pobreza. A menudo ocurre como una consecuencia del embarazo, especialmente en la adolescente embarazada. Los estudios estadounidenses han indicado una nutrición inadecuada de riboflavina en más del 10% de los niños, por encima del 47% en los adolescentes y más del 32% en los sujetos geriátricos. La arriboflavinosis puede ocurrir como un resultado de estados de enfermedad, incluyendo una enfermedad febril prolongada, neoplasia, hipertiroidismo, fallas cardíacas, *diabetes mellitus*, y enfermedades gastrointestinales. La malnutrición asociada con el alcoholismo afecta a la riboflavina así como a otros nutrientes. La descomposición de la riboflavina es acelerada por fototerapia para

ictericia neonatal, pero la deficiencia inducida no parece limitar la oxidación de los ácidos grasos dependiente de riboflavina. El balance negativo de nitrógeno, observado en todos los estados catabólicos (incluyendo estrés, ejercicio físico, ayuno, descanso prolongado en la cama), resulta en una excreción aumentada de riboflavina urinaria. La deficiencia de riboflavina ocurre a menudo concomitantemente con deficiencias de otras vitaminas B. Además, la riboflavina participa en los procesos metabólicos que involucran otras vitaminas. Estas interacciones pueden resultar, por lo tanto, en un cuadro clínico mixto y puede explicar cómo la terapia con una vitamina puede mejorar los síntomas de otra deficiencia vitamínica.

Las fenotiazinas, los anticonceptivos orales, y el desequilibrio hormonal pueden afectar el uso de la riboflavina; se ha reportado que la prednisolona interfiere con la conversión a coenzimas. Las miopatías cardíacas y esqueléticas inducidas por adriamicina pueden estar relacionadas a su fijación de riboflavina.[ref\(1620\)](#)

Piridoxina

La vitamina B₆ es conocida químicamente como *piridoxina*. El piridoxal y la piridoxamina fueron primeramente identificados con actividad vitamínica; luego, sus formas fosforiladas fueron reconocidas como cofactores activos. Así, actualmente el término *vitamina B₆* se refiere a la familia de compuestos estructuralmente relacionados con el fosfato de piridoxal (Fig. 39-7). La piridoxina existe principalmente en las plantas, mientras que el piridoxal y la piridoxamina están presentes principalmente en los productos animales. Estos tres derivados de la piridina se interconvierten metabólicamente.

Las principales fuentes de vitamina B₆ de la dieta son la carne, aves, pescado, papas, y vegetales; los productos de la leche y los granos contribuyen en menor cantidad. La forma predominante en el alimento es el fosfato de piridoxal, el cual se pierde rápidamente en el procesamiento de alimentos.

Metabolismo

La piridoxina no se une a las proteínas del plasma; el piridoxal y el fosfato de piridoxal se unen principalmente a la albúmina. Los eritrocitos toman rápidamente piridoxina, la convierten a fosfato de piridoxal y piridoxal, y luego liberan el piridoxal al plasma. El metabolismo del piridoxal parece tener lugar principalmente en el hígado con la formación del ácido 4-piridóxico, el cual es excretado en la orina (Fig. 39-7). La síntesis de fosfato de piridoxal depende de una enzima dependiente de flavina, la cual interrelaciona la nutrición de riboflavina y de piridoxina. La concentración de vitamina B₆ es alta en el cerebro y en el líquido cefalorraquídeo; las formas no fosforiladas se introducen mejor en el LCR, en el plexus coroideo y en el cerebro.

Función

La mayoría de las reacciones catalizadas dependientes de fosfato de piridoxal involucran transformaciones de aminoácidos; la gran excepción la brindan las fosforilasas. Las formas del cofactor piridoxina actúan en más de 60 sistemas enzimáticos diferentes catalizando una variedad de tipos de reacciones, incluyendo las transaminasas ASATs y las ALATs. Las funciones de los cofactores de piridoxina mejor conocidas son su participación



en la conversión de triptofano a 5-hidroxitriptamina (serotonina) y en una vía separada del triptofano al ribonucleótido del ácido nicotínico (la “vía de la niacina”), ambas se muestran en la Fig. 39-8.

Signos clínicos y químicos de deficiencia

Los signos clínicos de deficiencia de piridoxina para los niños y adultos están registrados en la Tabla 39-1. Los índices químicos de la disminución de piridoxina incluyen reducción de las concentraciones de piridoxina o de fosfato de piridoxal, en el plasma y en los eritrocitos. La piridoxina urinaria (generalmente representando menos del 10% de la ingesta de piridoxina) y de ácido piridóxico, el principal metabolito urinario, se encuentran también reducida. Una carga de triptofano administrada oralmente a personas en las que se sospecha que son deficientes en piridoxina resulta en la excreción de varios metabolitos del triptofano en mayores cantidades que lo usual, siendo el ácido xanturénico el que se cuantifica más comúnmente (Fig. 39-8). La participación de otros factores metabólicos y hormonales en esta vía necesita de interpretación cuidadosa de la prueba de triptofano. Se Puede establece el estado del tejido con relación a su contenido en fosfato de piridoxal por mediciones del aumento de la aspartato (o alanina) aminotransferasa eritrocitaria (ASAT O ALAT, respectivamente) después de adicionar *in vitro* del cofactor fosfato de piridoxal. El aumento en la relación de la actividad en presencia de más o menos fosfato de piridoxal (el índice EAST) es indicativo de un almacenamiento tisular inadecuado. Los individuos con baja cantidad de piridoxina pueden necesitar varios meses de recuperación para aumentar la actividad enzimática y reducir el índice de estimulación. El plasma de los individuos normales contiene, principalmente, fosfato de piridoxal y ácido 4-piridóxico con cantidades menores de piridoxal. Todas las vitaminas B₆ conocidas pueden medirse simultáneamente por HPLC. De las mediciones directas del estado de B₆, el fosfato de piridoxal plasmático es considerado el que mejor representa el estado tisular. Para evaluar el estado de vitamina B₆ se recomienda utilizar las mediciones de fosfato de piridoxal plasmático, el ácido 4-piridóxico urinario, y una medida indirecta (el índice EAST o ácido xanturénico urinario).[ref\(1621\)](#)

Fisiopatología

Las condiciones asociadas con los índices de piridoxina bajos incluyen la enfermedad celíaca, el alcoholismo agudo, las psicosis tales como paranoia y esquizofrenia, epilepsia, colitis ulcerativa, cálculos renales, y lactación. Aun cuando los niveles de piridoxal-5-fosfato sean bajos durante una fase aguda de infarto de miocardio, la deficiencia de B₆ no parece ser un factor de riesgo para la enfermedad coronaria isquémica.[ref\(1622\)](#) Los requerimientos de piridoxina aumentan durante el embarazo como resultado de la demanda fetal y de la inducción hormonal de enzimas maternas, las cuales aumentan los requerimientos maternos (infantes con bajos puntajes Apgar y bajo peso al nacer). Un nuevo compuesto de vitamina B₆ (adenosin N₆-dietiltioéter-N-piridoxamina-5- α-fosfato) es sintetizado por las células tumorales; concentraciones relativas mayores de esta vitamina B₆ en el suero de los pacientes con neoplasias malignas diferentes indican que la vitamina B₆ puede ser un marcador biológico de la presencia de tumor o metástasis.[ref\(1623\)](#)

Los fármacos que se sabe que antagonizan a la piridoxina incluyen la hidrazida del ácido isonicotínico (isoniazida, INH), los esteroides y la penicilamina. Los anticonceptivos



orales reducen los índices del estado de piridoxina; los cambios de ánimo depresivos en pacientes que reciben estos agentes se pueden asociar con el papel de la piridoxina en la síntesis de serotonina. La deficiencia de piridoxina favorece la susceptibilidad a la toxicidad por disulfuro de carbono. Los compuestos de vitamina B₆ son de baja toxicidad sistémica, y no se han detectado efectos teratogénicos.

Niacina

Hace más de 200 años, la pelagra (del italiano, que significa “piel áspera”), la cual se encuentra asociada con la diarrea, demencia, dermatitis, y la muerte fue atribuida a una dieta de gente pobre. Desde 1910 a 1935 la pelagra fue la enfermedad nutricional más grave en la historia de los Estados Unidos, con más de 150,000 casos reportados anualmente, la mayor parte de los cuales eran personas pobres del sur. En 1912 fue extraído el ácido nicotínico a partir del arroz y se vio que poseía efectos de tipo vitamina, pero no fue hasta 1935 en que se demostró que el ácido nicotínico (también llamado niacina) curaba la lengua negra en los perros (una enfermedad similar a la pelagra en humanos). De esta forma el nutriente responsable fue identificado como niacina, y su deficiencia estaba asociada a dietas ricas en cereales.

La niacina es un derivado simple de la piridina y es extremadamente estable. Moderadamente resistente al calor, al ácido, al álcali, la niacina está relacionada químicamente con la nicotina pero tiene propiedades fisiológicas muy diferentes. Las formas activas del cofactor del NAD o del NADP (Fig. 39-9) derivadas de la niacina también pueden ser sintetizadas a partir del triptofano hepático (Fig. 39-8), y por ende una dieta suficiente en triptofano puede abatir el requerimiento de niacina.

Las carnes y los granos son las principales fuentes de niacina y muchos productos alimenticios manufacturados son suplementados con esta vitamina, especialmente aquellos producidos a partir de cereales. La deficiencia en la dieta, es más probable en personas con dietas que consisten principalmente de maíz (tales como una dieta de grasa de cerdo y de sémola de maíz machacado o de sorgo). El maíz es especialmente pobre en triptofano, y parte de la niacina del maíz no se absorbe. La alta concentración de leucina en los cereales interfiere de alguna manera con la vía de la niacina y con la conversión de niacina en sus formas de cofactor. Se estima que 60 mg de triptofano equivalen a 1 mg de niacina. La mayor parte de las dietas tienen 600 mg de triptofano, pero las dietas bajas en proteína tienen mucho menos.

Metabolismo

Tanto la niacina como la nicotinamida son absorbidas rápidamente en el intestino. La niacina es transportada en la sangre principalmente por los eritrocitos. Existe poco almacenamiento de niacina en el cuerpo y la orina contiene nicotinamida y otros metabolitos de niacina (Fig. 39-9). La nicotinamida plasmática entra rápidamente al LCR, mientras que la niacina no. El tejido neural no expresa la vía de la niacina a partir del triptofano y por ello debe usar nicotinamida plasmática de la dieta o formas defosforiladas de los cofactores.

Función

El NAD y el NADP participan en un gran número de reacciones de óxido reducción catalizadas por deshidrogenasas incluyendo las deshidrogenasas de alcohol, glutamato,



glucosa-6-fosfato, y glicerol-3-fosfato. La reducción produce dihidronicotinamida (NADH o NADPH), que presenta una fuerte absorción a 340 nm, un hecho ampliamente usado en los ensayos con enzimas dependientes de nucleótidos de piridina (ver capítulo 54).

Signos clínicos y químicos de deficiencia

Los signos clínicos de deficiencia de niacina se indican en la Tabla 39-1. Las mediciones químicas del estado de niacina involucran principalmente los dos metabolitos urinarios principales; la N'-metilnicotinamida y la N'-metil-2-piridona-5-carboxilamida. La relación entre el compuesto de la 2-pirridona y la N'-metilnicotinamida disminuye en estados de deficiencia en niacina; también se observa reducción en los metabolitos individuales. Estos metabolitos también están presentes generalmente en el plasma. Solamente un pequeño porcentaje de la niacina administrada se excreta como niacina o como nicotinamida. La medición de niacina o sus nucleótidos en la sangre generalmente no se considera como un índice confiable del estado de niacina, aun cuando los eritrocitos de las personas deficientes tienen niveles bajos de NAD y NADP y grandes cantidades de ribonucleótido de nicotinamida.

Como en el caso de la piridoxina, la deficiencia de niacina provoca una mayor susceptibilidad a la toxicidad por disulfuro de carbono. Los anticonceptivos orales estimulan la vía metabólica de la niacina a partir de triptofano. La niacina y la nicotinamida son ampliamente utilizadas en megadosis en el tratamiento de la psilosis, de las condiciones psiquiátricas tales como la esquizofrenia, y de un amplio espectro de desórdenes circulatorios incluyendo la hipertensión, la trombosis cerebral y la claudicación intermitente (cojera). La niacina y sus análogos son usados en el tratamiento de algunos estados de hiperlipidemia para reducir los efectos cardíacos y vasculares.^{ref(1624)} El ácido nicotínico es uno de los diversos agentes que se sabe que elevan el colesterol HDL (esto es, el colesterol unido a la lipoproteína de alta densidad, conocida como HDL que significan High Density Lipoprotein); no está claro si esta terapia puede retardar o revertir la progresión de la aterosclerosis.^{ref(1625)} La respuesta de la hiperbilirrubinemia inducida por ácido nicotínico es de valor diagnóstico en pacientes con el síndrome de Gilbert.^{ref(1626)}

Tiamina

El beriberi, una enfermedad polineurítica, se creyó al principio que era causada por una toxina que era neutralizada por la cáscara de los granos de arroz. Se encontró posteriormente que esta enfermedad se debía a una deficiencia nutritiva causada por la remoción de un factor esencial que había en el arroz cuando éste era pelado. Finalmente, este factor antiberiberi fue aislado y cristalizado en 1925; luego se demostró que esta estructura es una pirimidina sustituida ligada por un grupo metileno a un tiazol sustituido (Fig. 39-10). Así pues, el nombre refleja sus componentes de los grupos amino y azufre (tia-).

La tiamina es fácilmente destruida en medio alcalino. Resiste temperaturas de hasta 100° C pero se descompone a temperaturas mayores, un hecho significativo para el caso de las comidas fritas o para aquellas cocinadas bajo presión. Altamente soluble en agua, la tiamina es fácilmente filtrada cuando los alimentos son lavados.

Las fuentes de tiamina incluyen la levadura, el trigo, los granos completos, y los panes y cereales enriquecidos, las nueces, porotos, papas, y la mayor parte de los vegetales. La deficiencia dietética se sospecha en personas con una dieta consistente principalmente de arroz



pelado; en alcohólicos; en personas con anorexia, con vómitos o diarrea; en pacientes postoperatorios. La deficiencia de tiamina es común en las personas mayores.[ref\(1627\)](#)

Metabolismo

La tiamina de la dieta se absorbe en el intestino por un proceso de mediado por un acarreador, que se satura con una ingesta oral de 10 mg. La tiamina de la sangre aparece en el LCR y en el cerebro en menor proporción; las formas fosforiladas son aun menos comunes. La tiamina es excretada sin transformarse o después de una ruptura entre los sistemas de anillos por microorganismos intestinales. El pirofosfato de tiamina (PFT) es la forma predominante en los tejidos, mientras que la tiamina es la forma principal en el plasma. Los eritrocitos contienen PFT a concentraciones aproximadamente cinco veces mayores que aquellas encontradas en el plasma. El hígado, el corazón y el cerebro poseen concentraciones mayores que la que poseen otros órganos.

Función

En su forma de cofactor PFT, la tiamina cataliza la decarboxilación de los α -ceto ácidos (piruvato y α -cetoglutarato), la decarboxilación oxidativa por las α -cetoácido deshidrogenasas, y la formación de los cetoles. El pirofosfato de tiamina funciona en las vías principales de los carbohidratos y también funciona en el metabolismo de los aminoácidos. El pirofosfato de tiamina (PFT) puede ser el derivado de tiamina liberado de los nervios después de una estimulación eléctrica, y como tal puede jugar un papel en la conductividad del ion sodio. Existe alguna evidencia del descenso del PFT cerebral y de un inhibidor de su síntesis (demostrable en tejidos y en orina) en pacientes con encefalopatía de Leigh.

Signos clínicos de deficiencia.

La Tabla 39-1 enumera los signos clínicos más importantes de la deficiencia de tiamina. El síndrome de Wernicke-Korsakoff responde a la terapia con tiamina, y existe evidencia de una anormalidad del metabolismo de los neurotransmisores, quizás involucrando PFT. Estos pacientes acumulan característicamente cantidades excesivas de piruvato y lactato en los fluidos fisiológicos.[ref\(1628\)](#)

Las variaciones genéticas de las enzimas dependientes de PFT modifican el efecto de la deficiencia de tiamina de la dieta. Aun cuando la mayor parte de los pacientes con deficiencia de tiamina no desarrollan el síndrome de Wernicke-Korsakoff, una deficiencia moderada conduce a trastornos de las principales funciones integrativas (incluyendo la memoria). Una deficiencia más severa produce ya sea beriberi “seco” o “húmedo”, pero rara vez ocurren los dos juntos.

Signos químicos de deficiencia

Los índices químicos de deficiencia de tiamina comúnmente empleados son la disminución de la tiamina urinaria, disminución en la actividad de la transcetolasa eritrocitaria (TCE) y estimulación de la TCE por PFT *in vitro*. Una deficiencia prolongada resulta en síntesis disminuida de la apoenzima de la TCE, y por lo tanto la prueba de estimulación de esta transcetolasa puede subestimar la magnitud de la deficiencia. Existe evidencia también de la reducción de la TCE en condiciones de mala nutrición, diabetes, y enfermedad del hígado sin un efecto de estimulación del PFT. Como puede ocurrir con la mayoría de las proteínas, la



heterogeneidad genética de la TCE ha sido demostrada en humanos, y no siempre se ha visto una correlación entre la estimulación de la TCE y la tiamina de la dieta o los signos clínicos. Existen reportes conflictivos acerca de la utilidad de los niveles de tiamina en la sangre; esto posiblemente se encuentre relacionado con las bajas concentraciones y con las dificultades de medición. La tiamina y sus tres fosfoésteres se pueden separar por HPLC.

Fisiopatología

Las poblaciones del sudeste asiático desarrollan comúnmente el beriberi ya que se alimentan de comidas ricas en sustancias con acción antitiamina. Las formas moderadas de deficiencia de tiamina son comunes entre las mujeres embarazadas, los adultos mayores, y los alcohólicos. La deficiencia en magnesio (común en los alcohólicos) dificulta el uso de tiamina. El uso de anticonceptivos orales puede inducir deficiencia.

El almacenamiento total de tiamina corporal es de solamente 30 mg, es decir, 30 veces el requerimiento diario. Los síntomas de deficiencia de tiamina pueden aparecer después de alrededor de un mes con una dieta deficiente en tiamina. La administración de tiamina se recomienda a menudo en personas con vómitos persistentes o con aspiración gástrica prolongada, y en aquellas que realizan ayunos prolongados. Los pacientes con esclerosis lateral amiotrófica esporádica típica presentan una incidencia muy alta de monofosfato de niveles reducidos de tiamina en el LCR, con inversión de la relación tiamina/TMP.[ref\(1629\)](#) Existe alguna evidencia de deficiencia de tiamina no detectada en niños crónicamente enfermos (aquellos que reciben alimentación nasogástrica o quimioterapia intensiva, o que reciben cuidado intensivo por un período de semanas).

Biotina

Los factores de crecimiento descubiertos separadamente bajo los nombres de bios II, coenzima R, y biotina resultaron ser similares; otra investigación demostró que el complejo de síntomas producidos en ratas al alimentarlas con clara de huevo cruda era corregido cuando los huevos eran cocidos o por el agregado de otros alimentos que probablemente contuvieran “vitamina H” o “factor protector X”. Fue determinada la asociación entre la vitamina H y la biotina, y el papel clínico de la biotina fue establecido cuando voluntarios humanos ingirieron grandes cantidades de claras de huevo crudas, y se confirmó que el “daño por clara de huevo” en los animales se corrige con biotina (estructura en la Fig. 39-11).

Numerosos alimentos contienen biotina, aunque no existe ningún alimento que sea especialmente rico (hasta 2 mg/100 g). La ingesta dietética es baja en el período neonatal a pesar del hecho de que las concentraciones aumentan a medida que los recién nacidos cambian del calostro a la leche materna madura. Se sabe que las bacterias entéricas sintetizan biotina, aun cuando aun no está aclarada la contribución relativa de esta fuente.

Metabolismo

La biotina es absorbida en la mitad proximal del intestino delgado y circula en la sangre en su mayor parte unida a las proteínas plasmáticas. La avidina, una glucoproteína de la albúmina del huevo, tiene gran afinidad por la biotina, lo que explica la deficiencia de biotina que resulta de una ingestión de clara de huevo cruda.

Función



La biotina es una coenzima que interviene en las reacciones de carboxilación y de intercambio de carboxilos. Las enzimas importantes incluyen la acetil CoA, la propionil CoA y la piruvato carboxilasas, así como la metilmalonil oxalacetato transcarboxilasa.

Signos Clínicos de Deficiencia

Son raros los casos de deficiencia por la dieta, pero cada uno de ellos tiene una historia de huevos crudos como componentes mayoritarios de la dieta ingeridos que va desde meses hasta años. La Tabla 39-1 menciona los signos más importantes por deficiencia de biotina.

Signos químicos de deficiencia

La deficiencia en la dieta está acompañada por disminución de biotina en la orina y en el plasma^{ref(1630)}, y por aumento de ácidos orgánicos en la orina, lo que indica una deficiencia funcional de b-metilcrotonil CoA carboxilasa y de propionil CoA carboxilasa. Las alteraciones genéticas de estas carboxilasas pueden resultar en estados dependientes de biotina lo que causa acidosis metabólica y requiere de dosis farmacológicas de biotina; estas deficiencias enzimáticas están demostradas en los leucocitos. La deficiencia genética de la biotinidasa, la cual puede detectarse por un ensayo de mancha de sangre, es tratada con biotina.^{ref(1631)}

Fisiopatología

Con la actual nutrición moderna las deficiencias de biotina son raras. Sin embargo, una deficiencia por biotina puede sospecharse en pacientes que reciben nutrición totalmente parenteral por un largo período.^{refs(1632)} No se ha descrito toxicidad por biotina,⁴⁴ aun cuando la administración por biotina en animales no deficientes, favorece la expresión génica y altera la utilización de la glucosa astrocitaria.

Acido Pantoténico

Un factor de crecimiento existente en todos los tipos de tejidos animales y vegetales fue primeramente designado como vitamina B₃, y más tarde denominado ácido pantoténico (del griego que significa “de cualquier lugar”). Este factor fue identificado químicamente en 1938, y su deficiencia estaba asociada con el “síndrome de los pies quemados” en 1949.

Las fuentes de la dieta incluyen el hígado y la carne de otros órganos, la leche, los huevos, los maníes, las legumbres, los hongos, el salmón, y los granos enteros. Aproximadamente el 50% del pantotenato que proviene de los alimentos se encuentra disponible para absorción. El pantotenato es inestable frente a los ácidos, álcalis, calor y algunas sales. Los microorganismos intestinales son una fuente de B₃ para los animales, posiblemente también para los humanos.

Metabolismo

Como se ve en la Fig. 39-2, el pantotenato es convertido metabólicamente a 4'-fosfopantotenina, la cual se une covalentemente tanto a la proteína sérica portadora de acilos como a la coenzima A. Poco se conoce del metabolismo del pantotenato. La excreción urinaria de pantotenato se correlaciona bien con la ingesta; no se observa saturación con ingestas de 10 mg/día. El pantotenato libre es la forma principal tanto en la orina como en el suero. En contraste con otras vitaminas B, la acumulación de pantotenato es gradual. Los tejidos que contienen pantotenato son el hígado, glándulas adrenales, cerebro, riñones, y

1598



corazón.

Función

La coenzima A es una coenzima transferidora de grupos acilos muy importante y forma parte en un gran número de reacciones de una gran variedad de tipos de reacción. Los derivados acilo de la coenzima A se forman primeramente (por unión tioéster), seguidos de la transferencia del grupo acilo a una molécula aceptora.

Signos clínicos y químicos de deficiencia

No se han reportado casos claros de deficiencia por pantotenato; la Tabla 39-1 describe signos clínicos observados en deficiencias inducidas experimentalmente. Un indicador de deficiencia es el pantotenato sanguíneo total de menos de 1000 mg/L y una excreción urinaria de menos de 10 mg/día. La mayor parte de las mediciones en el pasado han utilizado ensayos biológicos para el pantotenato libre, liberando pantotenato de la coenzima A mediante tratamientos enzimáticos múltiples.

Fisiopatología

En pacientes con malnutrición crónica, alcoholismo agudo y reumatismo agudo se han registrado bajos niveles de pantotenato en la excreción urinaria y en la sangre. Los pacientes con enfermedades circulatorias y cardiovasculares y aquellos con úlceras pépticas presentan ácido pantoténico circulante reducido; los alcohólicos crónicos tienen la excreción aumentada, una indicación del daño. Existe evidencia de que la incidencia aumentada de hipertensión en algunas poblaciones japonesas pueda estar relacionada con la deficiencia de pantotenato.^{ref(1633)} El pantotenato ha sido administrado en el período postoperatorio para estimular al tracto gastrointestinal y también para tratar la neuropatía inducida por estreptomycin. No se le conoce toxicidad.

Vitamina B₁₂

La anemia perniciosa fue descrita hace más de 100 años y fue reconocida como una enfermedad sujeta a la terapia de extracto hepático. El factor antipernicioso de la anemia (factor extrínseco), finalmente aislado, cristalizado y caracterizado entre 1948 y 1956, se conoce actualmente como la vitamina B₁₂. Al comienzo de los años 30 una entidad similar, la *anemia perniciosa del embarazo*, mostró ser diferente en el sentido que no respondía a la terapia de extracto de hígado pero sí respondía a una sustancia autolisada de la levadura. La purificación de esta sustancia condujo a su identificación como ácido pteroilglutámico, más comúnmente conocido como ácido fólico. Es así que, síntomas clínicos similares resultaron de deficiencias de dos estructuras totalmente diferentes (Figs. 39-13 y 39-14), ninguna de ellas podía reemplazar a la otra. Las similitudes clínicas y las interacciones metabólicas de la vitamina B₁₂ y del ácido fólico evidencian generalmente su función.

La vitamina B₁₂ posee un anillo de corrina (conteniendo pirroles similares a la porfirina) unidos a un átomo de cobalto central. Los pirroles son en su mayor parte saturados con cadenas laterales (grupos metilo, acetamida o propionamida). Los diferentes compuestos corrinoideos o cobalaminas se distinguen por el sustituyente unido al cobalto con metilcobalamina y 5'-desoxiadenosilcobalamina, los cuales constituyen las dos formas conocidas de la coenzima.



Las fuentes de vitamina B₁₂ de la dieta son de origen animal (carne, huevos, leche) excepto para la planta consuelda. Las dietas totalmente vegetarianas son, por lo tanto, propician una deficiencia. La vitamina B₁₂ de los animales deriva de la síntesis bacteriana. La dieta promedio diaria contiene 3 a 30 µg de vitamina B₁₂, de los cuales se absorben de 1 a 5 µg. La frecuencia de la deficiencia dietaria aumenta con la edad y ocurre en un 0.5% de las personas mayores de 60 años.

Metabolismo

La mayor parte de la vitamina B₁₂ se absorbe a través de un complejo con factor intrínseco (FI), una proteína secretada por las células parietales gástricas (Fig. 39-15). Este complejo FI-B₁₂ se une a receptores ilíacos específicos. Los anticuerpos “bloqueadores” de FI no permiten la unión de la vitamina B₁₂ al FI, y los anticuerpos “de unión” pueden combinarse ya sea con FI o con el complejo FI-B₁₂, evitando de esta forma la fijación del complejo a los receptores ilíacos y la absorción intestinal de la vitamina. Los anticuerpos de las células parietales también han sido identificados como una causa de la anemia perniciosa.

La vitamina B₁₂ liberada del complejo FI dentro de la célula de la mucosa circula en el plasma unida a proteínas transportadoras específicas y es depositada en el hígado, la médula ósea, y otros tejidos. Existe una significativa circulación enterohepática de vitamina B₁₂. Como resultado de esta absorción biliar, se requieren de 10 a 12 años para que un vegetariano estricto se vuelva clínicamente deficiente. Una persona con almacenamientos normales de B₁₂ pero que le falta el FI requiere menos tiempo (de 1 a 4 años) para que la deficiencia se haga evidente.

La transcobalamina II (TC II) parece ser la proteína más importante que transporta vitamina B₁₂ exógena a los tejidos. La cobalofilina (previamente R, o proteína de unión de migración rápida o TC I) transporta B₁₂ endógena y es el ligando de las cobalaminas de los alimentos. La saliva, la leche materna y los granulocitos contienen grandes cantidades de esta proteína de unión comparado con las cantidades relativamente pequeñas de cobalamina. El plasma contiene ambos tipos de proteínas de transporte y las tres formas de vitamina B₁₂ (hidroxicobalamina, metilcobalamina y desoxiadenosilcobalamina). La absorción y transporte de esta vitamina se ilustran en la Fig. 39-15.

Funciones

La forma de desoxiadenosilcobalamina (AdoCbl) es un cofactor para el metabolismo de los ácidos de número impar de átomos de carbono (formación de la cubierta de mielina); una deficiencia resulta en acumulación del intermediario metilmalonil CoA y en la excreción en la orina de ácido metilmalónico. La forma de metilcobalamina (MeCbl) es requerida para las reacciones de transferencia de grupos metilo; su falta ocasiona el bloqueo de la síntesis de DNA, anemia megaloblástica, y elevación de homocisteína. La deficiencia dietética del precursor de estas dos formas de coenzima provoca deficiencias de ambas cobalaminas activas. Se conocen las deficiencias genéticas de las enzimas de cualquiera de las vías. En los pocos casos reportados de deficiencia hereditaria de la TC II, aparecen síntomas de pancitopenia y dificultad para desarrollarse adecuadamente a los pocos meses del nacimiento. Varios estudios de envergadura han determinado una diferencia racial de los niveles de vitamina B₁₂ en el suero, con niveles de vitamina B₁₂ más elevados en los negros que en los

blancos.

Signos clínicos y químicos de deficiencia

La Tabla 39-1 enumera los signos de deficiencia de vitamina B₁₂. Las pruebas diagnósticas para la deficiencia de vitamina B₁₂ incluyen mediciones de B₁₂ séricas por métodos de ensayo microbiológico o de radioligando, mediciones del ácido metilmalónico o cisteína total, urinarios o séricos y la prueba de Schilling (ver págs. 590 y 788).

Los métodos anteriores sobre unión competitiva de B₁₂ sérica usaban fijadores de B₁₂ con especificidad de unión y pureza variables, originando resultados no confiables; existen numerosos reportes sobre la deficiencia de cobalamina en pacientes con concentraciones normales de cobalamina sérica. El análisis de la concentración del ácido metilmalónico del suero, por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, parece ser un indicador más sensible y específico de la deficiencia de cobalamina que las medidas directas de cobalamina sérica. La excreción urinaria del ácido metilmalónico ha sido recomendada como una prueba exploratoria sensible para la deficiencia de cobalamina no detectada entre los adultos mayores y los recién nacidos. Los pacientes urémicos presentan ácido metilmalónico sérico elevado sin relación aparente con el estado de cobalamina; las concentraciones en el LCR pueden ser normales en estos pacientes. Las enfermedades hepáticas no parecen afectar los valores de ácido metilmalónico sérico pero pueden elevar las cobalaminas séricas. Se ha reportado que el estado de acidemia metilmalónica del heterocigoto (2% de la población general) no eleva el ácido metilmalónico sérico. Se observa hiperhomocisteinemia cuando hay deficiencia de B₁₂, folato o vitamina B₆. No es un indicador temprano del estado de B₆ y no parece ser superior al ácido metilmalónico sérico como índice de deficiencia de B₁₂. La homocisteína plasmática ha sido usada para monitorear la inactivación de la cobalamina inducida por el óxido nitroso.[ref\(1634\)](#)

El establecimiento de la causa de la deficiencia de la vitamina B₁₂ puede requerir ensayos adicionales que incluyen pruebas para anticuerpos específicos, la prueba de supresión de desoxiuridina, y la evaluación de las proteínas de transporte.

La prueba de supresión de desoxiuridina está basado en el hecho de que la preincubación de la médula ósea normal con una concentración apropiada de desoxiuridina, suprime severamente la incorporación subsecuente de timidina tritiada en el DNA. Esta supresión es subnormal con la médula ósea proveniente de pacientes deficientes ya sea en vitamina B₁₂ o en folato y es corregida *in vitro* por la adición de la vitamina deficiente apropiada. Esta prueba mostrará también, resultados por debajo de los normales en pacientes con cambios megaloblásticos resultantes de agentes neoplásicos, quimioterápicos u otros agentes que interfieren con la síntesis de DNA.

Fisiopatología

La secreción inadecuada de factor intrínseco puede conducir a lesiones de la mucosa gástrica, atrofia gástrica, gastrectomía, deficiencia de hierro, y algunos desórdenes exocrinos. El complejo FI-B₁₂ se puede formar de manera inadecuada en la insuficiencia pancreática ya que no hay suficiente actividad de proteasa pancreática para separar la vitamina B₁₂ de la cobalofilina en el duodeno. El complejo FI-B₁₂ puede absorberse inadecuadamente en la

malfunción ilíaca (psilosis, enteritis, resección ilíaca, neoplasias, granulomas, etc.) Actualmente, el término anemia perniciosa se aplica comúnmente a la deficiencia de vitamina B₁₂ que resulta de la falta de FI. Los anticuerpos para FI y para las células parietales son comunes en los pacientes con anemia perniciosa, en sus parientes sanos, y en pacientes con otros desórdenes autoinmunes. Los anticuerpos bloqueadores pueden dar lugar a niveles séricos de B₁₂ normales o altos en los pacientes con anemia perniciosa. Numerosas sustancias inducen la mala absorción de la vitamina B₁₂, y la ingesta excesiva de ascorbato puede convertir a la vitamina B₁₂ en formas bloqueadoras análogas. La cobalofilina está elevada en los pacientes con desórdenes mieloproliferativos, policitemia vera, y varios neoplasmas. Existe evidencia de deficiencia de B₁₂ en algunos pacientes con demencia tardía. La hiperhomocisteinemia es un factor de riesgo independiente para la enfermedad vascular prematura y está asociada con el estado subóptimo de B₆, B₁₂ o folato. La homocisteinemia plasmática que se corrige por metilcobalamina ha estado asociada con la macroangiopatía diabética.[ref\(1635\)](#)

Acido Fólico

Los análogos estructurales del ácido pteroilglutámico (ácido fólico) son los compuestos metabólicamente activos referidos generalmente como folatos (ver Fig. 39-14). Se pueden encontrar hasta ocho residuos de glutamato en estos compuestos que existen naturalmente.

Los folatos de los alimentos se encuentran principalmente en los vegetales de hojas verdes, las frutas, carnes, y levadura. Hervir los alimentos excesivamente y el uso de grandes cantidades de agua destruyen el folato. La dieta estadounidense promedio puede considerarse inadecuada en folato, para los adolescentes y para las mujeres embarazadas o en lactancia.

Metabolismo

Los poliglutamatos de folato que existen en la naturaleza se hidrolizan a las formas monoglutamato antes de su absorción (la cual tiene lugar principalmente en el yeyuno proximal) por las células de la mucosa intestinal. Después de esto, el folato entra al hígado a través de la circulación porta. El hígado convierte algunos de estos monoglutamatos de folato a poliglutamatos, los que probablemente son luego almacenados; otra fracción del folato se excreta en la bilis como el N-5-metiltrahidrofolato (MeTHF), el cual es reabsorbido y es la forma circulante principal de folato. El folato sérico (MeTHF), en la forma de monoglutamato, entra rápidamente al plexus coroideo y al LCR. El ácido fólico, por otro lado, es transportado rápidamente desde el LCR hasta el plasma. Se ha identificado una proteína fijadora de folato en el plexus coroideo, probablemente responsable de la alta relación LCR/plasma. La forma LCR es, principalmente, MeTHF; los folatos cerebrales son formas predominantemente poliglutámicas de dihidrofolato (DHF). El catabolismo del folato involucra ruptura del anillo de pterina, seguido de acetilación para formar el producto excretado, ácido *p*-acetamidobenzoilglutámico.

Función

El folato (MeTHF) es un cofactor para las reacciones enzimáticas que involucran la transferencia de un carbono. Después de la entrada a la célula, el MeTHF es convertido a THF mientras se transfiere un carbono a la homocisteína para formar metionina. Como se

mencionó previamente, esta reacción requiere de vitamina B₁₂. En ausencia de vitamina B₁₂, el folato está atrapado esencialmente en la forma de MeTHF por lo que no está disponible para otras reacciones, incluyendo la síntesis de timina para el DNA (Fig. 39-16).

Signos clínicos y químicos de deficiencia

El síntoma clínico más importante de la deficiencia de folato es la anemia megaloblástica. Los índices químicos de deficiencia son, en orden de aparición, folato sérico bajo (ver Tabla 39-2), hipersegmentación de los neutrófilos, FIGLU (ácido formiminoglutámico) urinario alto (un metabolito de histidina que se acumula en ausencia de folato), folato eritrocitario bajo, macro ovalocitosis, médula megaloblástica, y finalmente anemia. La prueba de supresión de desoxiuridina, discutida con la vitamina B₁₂, es también un índice del estado de folato. El folato sérico, aun cuando es un índice temprano de deficiencia, a menudo puede estar bajo a pesar de un almacenamiento tisular normal. La hipersegmentación de los neutrófilos puede no apreciarse en la deficiencia de folato de las mujeres embarazadas. La prueba de FLIGU urinario requiere la ingestión de una cantidad oral de histidina, seguido por una colecta de orina en un tiempo determinado, y puede ser anormalmente alta en deficiencia ya sea de folato o de vitamina B₁₂. Debido a que la mayor parte del almacenamiento de folato tiene lugar después del paso dependiente de B₁₂, el folato eritrocitario puede también reducirse cuando hay deficiencia ya sea de B₁₂ o de folato. A pesar de este traslape, la concentración de folato eritrocitario es generalmente aceptada como el mejor índice de laboratorio de la deficiencia de folato. Como se indicó en la discusión de la vitamina B₁₂, el aumento de homocisteína en el suero o en la orina tiene lugar cuando existe deficiencia de folato. Generalmente, se mide la homocisteína total, la cual representa la suma de todas las especies de homocisteína. Actualmente, la utilidad diagnóstica de esta medida de deficiencia de folato es incierta en relación a las medidas directas de folato.[ref\(1636\)](#)

Fisiopatología

El requerimiento de folato aumenta durante el embarazo y especialmente durante la lactancia. El aumento durante la lactancia se debe parcialmente a la presencia, en la leche, de ligandos de alta afinidad por el folato. Otros ejemplos sobre un gran requerimiento de folato incluyen las anemias hemolíticas, deficiencia de hierro, premadurez, y mieloma múltiple. Los pacientes que reciben tratamiento de diálisis pierden folato rápidamente. La deficiencia de folato debido a una mala absorción puede ocurrir en la spilosis, enfermedad celíaca, enfermedades inflamatorias del intestino, paro cardíaco e infecciones bacterianas sistémicas. Tanto las condiciones ácidas como las básicas pueden interferir con el transporte intestinal; los aniones orgánicos que se acumulan en la uremia también alteran la absorción del folato. Se han informado alteraciones genéticas en la mayoría de las enzimas que interconvierten el folato. Se han descrito algunos casos de niños mentalmente retardados, incapaces de transferir folatos de la sangre al LCR; esto se debe probablemente a sistemas anormales de unión a transportadores de folato, en el sistema nervioso central. La deficiencia de folato de origen dietético ocurre comúnmente en los adultos mayores.[ref\(1637\)](#)

La terapia con fenitoína (Dilantina) acelera la excreción de folato e interfiere con la absorción y el metabolismo del folato. El alcohol interfiere con la circulación enterohepática de folato, mientras que el metotrexato, agente quimioterapéutico, inhibe la enzima

dehidrofolato reductasa. Aunque puede existir folato sérico disminuido con el uso de anticonceptivos orales (dependiente del ciclo diurno), no se cree que esto cause un déficit funcional, al menos que esté presente algún otro problema. Sin embargo, ha habido preocupación expresa de que podría existir una relación entre la deficiencia de folato cervical inducido por anticonceptivos y el carcinoma cervical. Se ha reportado una proteína específica que se une al folato, posiblemente proveniente de una fuente granulocítica, existente en el suero de algunas mujeres que recibieron anticonceptivos orales o que estaban embarazadas.

La forma terapéutica del folato es 5-formil-THF (también conocida como leucovorina, factor citrovorum, o ácido folínico). Esta forma de folato puede desviarse de la vía del MeTHF y entrar a los ciclos de reacciones de transferencia de un carbono dependientes de folato (ver Fig. 39-16). Este hecho es útil para la “liberación de leucovorina” de los pacientes con cáncer a los que se les administra una terapia de grandes dosis de metotrexato, que resultan tóxicas. El uso de suplementos de folato durante la concepción y al comienzo del embarazo se recomienda actualmente para disminuir la aparición de defectos en los tubos neurales.[ref\(1638\)](#)

Carnitina

La carnitina, incluida la L-carnitina y sus ésteres de ácidos grasos (Acilcarnitinas. ver Fig. 39-17), se describe como un nutriente “condicionalmente esencial”.

Las principales fuentes de la dieta son la carne, aves, pescado, y productos lácteos. Los alimentos de origen vegetal contienen generalmente muy poca carnitina (siendo las excepciones la manteca de maní, el espárrago y los aguacates). Las dietas promedio proporcionan más de la mitad del requerimiento humano; las dietas vegetarianas estrictas proporcionan solamente un 10% del total de la carnitina disponible. La mayor parte de la carnitina de la dieta es absorbida.

Metabolismo

La síntesis endógena involucra los residuos de N-trimetil lisina de las proteínas; la velocidad de biosíntesis está determinada por el suministro disponible de estos residuos de N-trimetil lisina. La síntesis se lleva a cabo en el hígado, cerebro, y riñón, con almacenamiento en el músculo principalmente. La carnitina no es degradada pero es excretada principalmente en la orina tanto en forma libre como esterificada.

Función

La L-carnitina facilita la entrada de los ácidos grasos de cadena larga en la mitocondria para su oxidación y producción de energía. Como muestra la Fig. 39-18, los ésteres de coenzima A de los ácidos grasos de cadena larga (acil-SCoA) son transesterificados a L-carnitina por medio de la catálisis de una enzima de la membrana mitocondrial externa, CPT-I (carnitina palmitoil transferasa I). Una vez dentro de la membrana interna, el ácido graso de cadena larga es nuevamente transesterificado (por la CPT II) produciendo el éster de coenzima A, el cual puede entrar en la vía de la β -oxidación para la producción de energía. El “transportador” de carnitina puede entonces dejar la mitocondria para ser reutilizado o puede servir para su otra función conocida y transportar ácidos grasos de cadenas medianas o cortas que se acumulan en el metabolismo normal o anormal. Los ésteres de carnitina pueden ser



excretados en la orina o distribuidos en los tejidos; algunos pueden utilizarse para propósitos específicos.

Signos químicos de deficiencia

Los signos principales de deficiencia de carnitina son debilidad y fatiga muscular. Los índices químicos de deficiencia incluyen disminución de carnitina total o libre en el suero, la orina, o los tejidos; las mediciones son generalmente radioenzimáticas. La carnitina total se mide después de la hidrólisis de las formas éster a carnitina libre; las acilcarnitinas representan la diferencia entre estas dos mediciones. Los ésteres de cadena corta y larga pueden distinguirse por su solubilidad. La caracterización de los ésteres individuales es útil en el reconocimiento de los desórdenes del metabolismo de los ácidos grasos; las técnicas incluyen cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masa, y de espectrometría de masas por bombardeo rápido de átomos.[ref\(1639\)](#) En los trastornos de la oxidación de ácidos grasos y también en la cetosis (exceso de acetil carnitina) se observan cocientes anormalmente altos entre acilcarnitina y carnitina libre.

Fisiopatología

La deficiencia humana puede ser hereditaria (deficiencia sistémica de carnitina, deficiencia miopática de carnitina) o adquirida. La deficiencia adquirida puede ser causada por ingesta inadecuada, demanda aumentada (embarazo y alimentación por pecho), o pérdida urinaria aumentada (terapia del ácido valproico). Los bebés, los pacientes que siguen una nutrición parenteral de larga duración, y quizás los niños, son los grupos más vulnerables a la deficiencia considerando sus niveles circulantes disminuidos y los indicadores alterados del metabolismo energético. Los pacientes que reciben hemodiálisis pueden perder carnitina en el fluido de la diálisis. La pérdida excesiva se observa también en el síndrome de Fanconi. La producción excesiva de ácidos (síndrome de Reye, acidemias orgánicas y terapia crónica de ácido valproico) se acompaña también de una conversión excesiva de carnitina a la forma de éster. Estas deficiencias secundarias pueden generar disfunción muscular. Las deficiencias principales muestran debilidad y fatiga musculares y pueden también involucrar afecciones cardíacas y hepáticas. Se están evaluando las terapias con carnitina para estas circunstancias, así como en pacientes con trastornos en el metabolismo del amoníaco. Se ha visto que el éster de tres carbonos propionil-L-carnitina, protege al corazón isquémico del daño por reperfusión. La función de los pacientes con la enfermedad de Alzheimer se ha visto mejorada por el tratamiento con la acetil-L-carnitina. Los mecanismos de estos procesos no están claros aún.[ref\(1640\)](#)

Las Vitaminas como Antioxidantes[refs\(1641\)](#)

Los radicales libres son moléculas altamente reactivas generadas durante el metabolismo ordinario y a partir de ciertas sustancias o xenobióticos (productos químicos ajenos). La exposición a la luz ultravioleta, al humo del cigarrillo, y a otros contaminantes ambientales aumenta la carga corporal de radicales libres. Estos radicales libres de vida corta pueden dañar las membranas, enzimas, y el DNA. Existe un conjunto de defensas antioxidantes en las células y tejidos para evitar la formación o limitar los efectos de los



radicales libres. Los radicales libres han sido considerados como una posible causa de cáncer y de enfermedad cardiovascular. Las vitaminas C y E y el β -caroteno protegen del cáncer de pulmón y de otros tejidos epiteliales por medio de una variedad de mecanismos. Se están llevando a cabo ensayos de intervención en humanos probando la eficacia de estos compuestos como agentes anticáncer. La evidencia reciente indica que la apoproteína lipoproteína (LDL o "Low Density Lipoproteína") de baja densidad puede ser modificada por un proceso de peroxidación lipídica conducida por radicales libres. La proteína ApoB modificada resultante tiene alterada la afinidad por el receptor, lo cual conduce al proceso de limpieza por los macrófagos y a la iniciación de la lesión aterosclerótica. Esta peroxidación puede evitarse por la vitamina E endógena transportada en los lípidos LDL. El consumo de antioxidantes está asociado con el desarrollo tardío de varias formas de cataratas. Los ensayos clínicos indican respuestas inmunes mejoradas en los adultos mayores después del suministro de las vitaminas C, E, y A o β -caroteno. El suplemento con vitamina A disminuye la morbilidad y la mortalidad asociada a la infección por sarampión en los niños. Además de las evaluaciones específicas de los compuestos antioxidantes, las mediciones del estado antioxidante global incluyen aliento de pentano, resonancia electrónico del spin, y mediciones del daño de bases del DNA. Actualmente acaba de comenzar la exploración sobre el papel del daño oxidativo, y de los efectos protectores y quizás terapéuticos de los antioxidantes.

Métodos de Análisis

Acido Ascórbico (Vitamina C)

Steven C. KAZMIERCZAK

Principios de análisis y uso actual

El ácido ascórbico (AA) es un agente fisiológico reductor y muchos métodos están basados en la oxidación del ácido ascórbico a ácido dehidroascórbico o en sus propiedades reductoras. Ejemplos de dichos ensayos basados en un colorante indicador son los métodos del 2,6 diclorofenol-indofenol y del complejo ferroso cromogénico. En el método del 2,6-diclorofenol-indofenol, el ácido ascórbico reduce al colorante, causando una disminución de la absorbancia a 520 nm.[ref\(1642\)](#) Las desventajas de esta técnica incluyen su poca sensibilidad y falta de especificidad; otra variedad de compuestos pueden reducir al colorante.[ref\(1643\)](#)

En el método del complejo ferroso cromogénico, el ácido ascórbico reduce el ion férrico a ion ferroso.[ref\(1644\)](#) El ion ferroso reacciona luego con un agente quelante, como el 2,2-dipiridil o Reactivo de Hierro Ferrozina, para formar un complejo coloreado que puede ser detectado espectrofotométricamente. Este método también sufre de la falta de sensibilidad e interferencia de una variedad de sustancias. Las modificaciones introducidas para reducir los efectos de los compuestos que interfieren en el ensayo así como el ensayo del 2,6 diclorofenol-indofenol, hacen que la realización de estos ensayos sea tediosa. Debido a estos y a otros inconvenientes, casi ninguno de estos ensayos de reducción del ácido ascórbico es usado actualmente.

El método más ampliamente utilizado para el ácido ascórbico es el método de la 2,4 dinitrofenilhidrazina (Tabla 39-3, método 1). En este procedimiento, el ácido ascórbico en

1606



primer lugar es oxidado a ácido dehidroascórbico y luego a ácido 2,3 dicetoglucónico. El cobre es el agente más común para la oxidación; sin embargo, también pueden ser utilizados el carbón activado, el 2,6-diclorofenol-indofenol y la benzoquinona.[ref\(1645\)](#) Después del paso inicial de oxidación del ácido ascórbico, se agrega la 2,4-dinitrofenilhidrazina para formar bis-2,4-dinitrofenilhidrazona. Mediante el tratamiento con ácido sulfúrico se forma un producto coloreado que absorbe a 520nm. Este método mide el contenido total de vitamina C de la muestra, ya que el ácido ascórbico, el ácido dehidroascórbico y el ácido dicetogulónico son también determinados. Este ensayo está sujeto a interferencia de azúcares y de aminoácidos, tiosulfatos, y ácido glucorónico.[ref\(1646\)](#)

Las determinaciones fluorométricas del ácido ascórbico han sido desarrolladas aun cuando son raramente usadas. El ácido ascórbico primeramente es oxidado a ácido dehidroascórbico y luego reacciona con el o-fenilendiamina para formar un derivado de la quinozalina que es un fluoróforo.[ref\(1647\)](#) Este método mide tanto el ácido ascórbico como el ácido dehidroascórbico.

Se han desarrollado ensayos enzimáticos para el ácido ascórbico que utilizan la oxidasa del ácido ascórbico (Tabla 39-3, método 2). La oxidasa del ácido ascórbico es altamente específica para la oxidación del ácido ascórbico en ácido dehidroascórbico.[ref\(1648\)](#) Las muestras son incubadas con y sin ácido ascórbico oxidasa y luego reaccionan con el hierro férrico más un reactivo capaz de formar el complejo 2,4,6-tris(2-piridil)-S-triazina. La absorbancia del complejo es monitoreada a 593 nm. La diferencia en absorbancia entre las muestras con y sin la oxidasa del ácido ascórbico es proporcional a las concentraciones del ácido ascórbico.

La cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) ha sido desarrollada a fin de resolver la poca sensibilidad y especificidad de algunos de los métodos previamente descritos (Tabla 39-3, método 3). Los métodos del HPLC pueden medir ácido ascórbico, ácido dehidroascórbico y el estereoisómero del ácido ascórbico, el ácido isoascórbico. Estos métodos del HPLC utilizan tanto los esquemas de detección ultravioleta como los de detección electroquímica. La detección ultravioleta hace uso del pico de absorbancia de la vitamina a 265-266 nm, mientras que la detección electroquímica del ácido ascórbico se basa en la facilidad con que se oxida la vitamina para tornarse eléctricamente activa. Las ventajas de las mediciones del ácido ascórbico por medio de HPLC incluyen el aumento en la sensibilidad y la especificidad ya que se minimiza la interferencia de sustancias. Debido a estas ventajas, la determinación del ácido ascórbico por HPLC es la técnica preferida.

Muestra.

El suero o plasma recogidos en tubos que contienen EDTA, oxalato, y heparina pueden usarse para la mayoría de los ensayos. La estabilidad del ácido ascórbico en las muestras biológicas no ha sido adecuadamente establecida.[ref\(1649\)](#) Han sido descritas pérdidas del 6% al 12% de ácido ascórbico a partir de las concentraciones basales para las muestras plasmáticas que no han sido refrigeradas o desproteinizadas.[ref\(1650\)](#) La preparación de sobrenadantes de suero o de muestras de plasma con ácido metafosfórico o ácido perclórico que no van a ser inmediatamente analizadas, puede ayudar a evitar la pérdida de ácido ascórbico si estas muestras libres de proteínas son almacenadas a -20° C durante dos semanas o menos. Sin embargo, éste y otros compuestos reductores conteniendo grupos tiol pueden interferir en el procedimiento ampliamente usado de la 2,4-dinitrofenilhidrazina.



La presencia de cualquier hemólisis es una causa para desechar las muestras utilizadas en la medición de ácido ascórbico. La hemoglobina causa una oxidación muy rápida del ácido ascórbico. Las muestras de plasma pueden ser una alternativa óptima debido a que algo de hemoglobina puede liberarse de los eritrocitos durante el proceso de coagulación.

Intervalo de referencia.

Se ha encontrado que los individuos con una dieta normal tienen concentraciones de ácido ascórbico de 6.0 a 20.0 mg/l (0.034 a 0.110 mmol/L). Las concentraciones de ácido ascórbico menores de 2.0 mg/L están asociadas con un alto riesgo de desarrollar escorbuto. La saturación de los tejidos con ácido ascórbico da lugar a concentraciones plasmáticas de ácido ascórbico de 10 a 15 mg/L (0.057 a 0.085 mmol/L).

Ácido Fólico

Steven C. KAZMIERCZAK

Principios de análisis.

Las técnicas para medir folato incluyen los ensayos microbiológicos y los inmunoensayos de unión competitiva que emplean radioisótopos, fluorescentes, quimioluminiscentes y marcadores enzimáticos. Los ensayos microbiológicos fueron los primeros en ser desarrollados para medir folato (Tabla 39-4, método 1). Este ensayo está basado en la medición del crecimiento del organismo *Lactobacillus casei*, el cual requiere ácido metiltetrahidrofólico para su crecimiento; el crecimiento del organismo está directamente relacionado con la concentración de folato en la muestra del paciente.

El crecimiento del organismo es monitoreado por medición de la turbidez de la solución de crecimiento. Los ensayos microbiológicos para el folato ya no son utilizados en forma rutinaria en el laboratorio clínico, debido a la naturaleza tediosa de sus determinaciones. Existe un reporte reciente de un ensayo microbiológico que mide folato utilizando una placa de microevaluación de 96 pozos.[ref\(1651\)](#) Se encontró que este procedimiento requiere menos tiempo de realización que los ensayos microbiológicos tradicionales y que era extremadamente económico cuando se comparaba a los métodos competitivos de unión a proteína.

Los métodos más comunes en uso para el análisis de folato son las técnicas radiométricas competitivas de unión a proteína (Tabla 39-4, método 2). Estos métodos están basados en la unión competitiva entre el folato presente en la muestra del paciente y el folato marcado radioisotópicamente para un número limitado de sitios en el agente de unión. Los agentes de unión comúnmente utilizados derivan de la leche[ref\(1652\)](#), cuyas afinidades variables para las diferentes formas de folato son dependientes del pH.[ref\(1653\)](#)

El ensayo de unión a proteína puede llevarse a cabo como un ensayo consistente de un sólo paso o de dos pasos. El ensayo de un sólo paso es el más simple de llevar a cabo e involucra la combinación simultánea de la muestra, la proteína de unión y el reactivo trazador.

El ensayo de dos estados es más sensible que el primero e involucra una incubación secuencial no competitiva. En el primer paso del procedimiento, la muestra del paciente es incubada con el ligando proteico. Después de un paso de incubación, la temperatura se disminuye a 4° C para minimizar la disociación del folato del ligando proteico, y luego se agrega el folato radiomarcado para ocupar cualquiera de los sitios de unión que quedaron. La separación del folato marcado unido del no unido generalmente se realiza con carbón activado



cubierto de dextrano a 4° C.

Los métodos no radioisotópicos competitivos de unión a proteína han sido desarrollados para permitir un análisis automático del folato en el suero (Tabla 39-4, método 3). Un ejemplo lo constituye un ensayo de partición radial competitivo (Baxter Diagnostics, Miami, Florida), en el cual el folato presente en la muestra del paciente es reducido primeramente y luego extraído de las proteínas de unión endógenas. En la etapa siguiente del ensayo, el folato se agrega a una matriz fibrosa que contiene una proteína que se une al folato, adherida a la matriz fibrosa con un anticuerpo proteico antifolato. A continuación, un conjugado enzima-folato (fosfatasa alcalina) se agrega para que se combine con los sitios remanentes de unión al folato. En el último paso del ensayo, el conjugado de enzima-folato no unido, se eluye del área de reacción de la matriz fibrosa, y se agrega el sustrato de la enzima. La cantidad de producto formado es inversamente proporcional a las concentraciones de folato en la muestra del paciente.

La mayor parte de los ensayos de folato no isotópico son ensayos heterogéneos similares a los descritos arriba. Sin embargo, el procedimiento de polarización de fluorescencia de Abbott es un ensayo homogéneo.

El suero contiene proteínas de unión endógenas que pueden unirse al folato, causando la medición de bajas concentraciones de folato séricas que resultan erróneas. Estas proteínas de unión endógenas pueden ser inactivadas por productos químicos o por ebullición a pH alto con 2-mercaptoetanol. Se debe tener cuidado, sin embargo, de no destruir el folato endógeno en estos pasos de extracción.

Además de las determinaciones de folato sérico o plasmático, pueden llevarse a cabo determinaciones de folato en los eritrocitos. Los estudios han mostrado que la medición de las concentraciones de folato en los eritrocitos es de mayor utilidad clínica que las concentraciones de folato séricas para el diagnóstico de la anemia megaloblástica.[ref\(1654\)](#) Sin embargo, muchos laboratorios realizan ensayos para el folato sérico solamente. La razón puede deberse a la inconveniencia de los estuches isotópicos duales para la determinación simultánea del folato sérico y de la vitamina B₁₂,[ref\(1655\)](#) o a la variabilidad aumentada e inexactitud asociadas al análisis de folato en los glóbulos rojos. Estos problemas analíticos pueden ser el resultado de las diversas formas de folato en los eritrocitos y del problema de convertir adecuadamente todas las formas al monoglutamato reducido (metiltetrahidrofolato) durante el análisis.[ref\(1656\)](#) El folato sérico está casi exclusivamente presente en la forma de monoglutamato. Sin embargo, en los glóbulos rojos está presente en la forma de poliglutamato y como complejos de alto peso molecular.[ref\(1657\)](#)

Muestra

Las muestras para el análisis de folato sérico o plasmático deben ser colectadas de individuos en ayuno, debido a que los niveles de folato pueden variar con la ingesta de comida que contiene esta vitamina. Las muestras de plasma pueden tomarse en tubos que contengan EDTA o heparina; sin embargo, si la muestra va a ser usada para determinación simultánea de B₁₂, la heparina debe evitarse porque puede formar un complejo con la vitamina B₁₂. El suero o el plasma puede mantenerse durante 24 horas a 4° C sin pérdida significativa de folato. Para almacenamiento por períodos mayores, estas muestras deben ser congeladas a -10C. Las muestras hemolisadas son inadecuadas para el análisis debido a las altas concentraciones de folato encontradas en los glóbulos rojos.



La sangre total para el análisis de folato eritrocitario puede colectarse usando oxalato y heparina como anticoagulante. El hematocrito de la muestra debe determinarse también de manera que los resultados puedan expresarse como una función de la masa de glóbulos rojos. El folato intracelular puede ser liberado por congelamiento y descongelamiento de la muestra o por incubación de la muestra con ácido ascórbico. El folato en el lisado eritrocitario es estable por tiempos mayores de 4 días a 4° C si se agrega ácido ascórbico al lisado (5mg/mL).

Intervalo de referencia

El intervalo de referencia para el folato en el suero o en el plasma se establece a menudo en 1.9 a 14 ng/mL (4.3 a 31.7 pmol/mL). El nivel de folato es mayor en los niños. Para los niños de 1 a 12 años el folato sérico se encuentra entre 2.0 a 11.9 ng/mL (de 4.5 a 27.0 pmol/mL para los varones y de 2.5 a 13.8 pmol/mL para las niñas). En las personas de 13 a 18 años de edad, ha sido reportada una disminución significativa en las concentraciones de folato, con un límite superior de referencia de 8.8 ng/mL (19.9 pmol/L) en los hombres y de 7.3 ng/mL (16.5 pmol/L) en las jóvenes.

Vitamina B₁₂

I-Wen CHEN

Matthew I. SPERLING

Linda A. HEMINGER

Principios de análisis

Los métodos de medición de la vitamina B₁₂ han incluido ensayos microbiológicos e inmunoensayos radioisotópicos y no radioisotópicos de unión competitiva. Desafortunadamente, los ensayos actuales para la cuantificación de la vitamina B₁₂ a menudo se enfrentan a problemas de poca precisión así como a la incapacidad de medir directamente la vitamina B₁₂.^{ref(1658)}

Los ensayos microbiológicos (Tabla 39-5, método 1) fueron los primeros procedimientos establecidos para medir la vitamina B₁₂. Aunque ya no es utilizado rutinariamente, este ensayo puede considerarse el método de referencia ya que mide solamente la vitamina biológicamente activa. Los ensayos microbiológicos están basados en el requerimiento de vitamina B₁₂ como factor de crecimiento por ciertos microorganismos. La magnitud del crecimiento bacteriano es directamente proporcional a la vitamina B₁₂ disponible en la muestra.^{ref(1659)} Se prepara una curva estándar midiendo el crecimiento bacteriano en soluciones con cantidades conocidas de vitamina. El crecimiento bacteriano se mide típicamente por turbidimetría. Se han utilizado una gran variedad de bacterias en los ensayos microbiológicos; la primera en ser utilizada fue el *Lactobacillus lactis*.^{ref(1660)} Ajustes posteriores de esta técnica llevaron al uso de *Euglena gracilis*⁷⁷ u *Ochromonas malhamensis*⁷⁸. Estos dos últimos microorganismos se consideran los más sensibles y los organismos más específicos para los ensayos de vitamina B₁₂. Aun cuando los ensayos microbiológicos son específicos para B₁₂, ellos adolecen de limitaciones técnicas y logísticas. Concentraciones altas de folato pueden inhibir el crecimiento bacteriano, y el desoxirribunucleósido puede reemplazar parcialmente a la **vitamina**⁷⁸. La sensibilidad del ensayo es relativamente pobre,



haciendo difícil la detección bajas concentraciones de la vitamina encontrada en ciertos fluidos corporales. Los ensayos microbiológicos requieren técnicas estériles y por lo tanto no pueden ser utilizadas para muestras que contengan ciertos antibióticos.

Los métodos más frecuentemente usados para la determinación de vitamina B₁₂ son los radioinmunoensayos competitivos de unión a proteína (Tabla 39-5, método 2). Estos ensayos están basados en el principio de que la vitamina B₁₂, que ha sido liberada de las proteínas de unión endógenas, puede ser medida por su competencia con la B₁₂ marcada con ⁵⁷Co para una cantidad limitada de una proteína de unión específica. La proteína de unión típicamente utilizada es el factor intrínseco porcino. Deben ser tomadas en cuenta medidas especiales con objeto de eliminar la interferencia causada por otras, proteínas de unión no específica de la vitamina B₁₂. Estos ligandos proteicos no específicos se les conoce comúnmente como proteínas R o ligandos R. Ellos muestran una movilidad rápida (por eso se denominan R) en la electroforesis. Estas proteínas se encuentran en el jugo gástrico humano y presentan una alta afinidad de unión por la vitamina B₁₂.

Los ensayos radioisotópicos comercialmente disponibles utilizan típicamente cualquiera de las dos técnicas para analizar las proteínas fijadoras de B₁₂. Algunos ensayos emplean análogos de vitamina B₁₂ como bloqueadores de las proteínas R, mientras que otros usan desnaturalización por calor en agua hirviendo para remover los compuestos que **interfieren**⁷⁸. Algunos ensayos utilizan desnaturalización química de los compuestos que interfieren y así se elimina el paso de ebullición. Se ha encontrado que los procedimientos últimos de que no utilizan el procedimiento de ebullición no desnaturalizan completamente los anticuerpos de factores anti-intrínsecos.^{ref(1661)} Algunas operaciones del ensayo pueden exhibir un alto grado de unión proteica no específica como resultado de una inactivación incompleta de las proteínas de unión endógenas séricas, de separación inadecuada de radioisótopos libres y ligados, o del uso de ligandos no específicos de la vitamina B₁₂.^{ref(1662)}

Se han desarrollado varios ensayos no radioisotópicos para la vitamina B₁₂ para uso rutinario de laboratorio. Un procedimiento utiliza un inmunoensayo competitivo de separación magnética (Tabla 39-5, método 3). Este ensayo ha sido automatizado (Miles Inc, Tarrytown, NY 10591) y se basa en la unión competitiva de la proteína. En la primera fase del ensayo, la vitamina B₁₂ se libera de las proteínas de unión endógenas usando un reactivo pretratado conteniendo ditioneol, NaOH y KCN. Después, la vitamina B₁₂ liberada se hace reaccionar con el reactivo que contiene el factor intrínseco. Luego de un paso de incubación, la vitamina B₁₂ que se encuentra conjugada con la fosfatasa alcalina (FA) se introduce en el sistema. Este conjugado enzima-vitamina B₁₂ entabla una competencia con la vitamina B₁₂ de la muestra por los sitios de unión de la proteína en el factor intrínseco. La separación de la vitamina B₁₂ unida y libre está acompañada del uso de anticuerpos monoclonales ligados a una partícula magnética. Las partículas monoclonales magnéticas se unen a los complejos Vitamina B₁₂-factor intrínseco. En el paso final del ensayo, se agrega el sustrato para la enzima marcada (*para* o *p*-nitrofenil fosfato). El sustrato se degrada produciendo *p*-nitrofenóxido, el cual puede ser monitoreado espectrofotométricamente a 405 nm. Las muestras que no contienen vitamina B₁₂ tendrán un máximo de unión entre la vitamina B₁₂ enzimáticamente marcada y el factor intrínseco, exhibiendo de esta manera lecturas de absorbancia máxima, mientras que las muestras con concentraciones aumentadas de B₁₂ tendrían un nivel mínimo de marca unida.



Un ensayo basado en principios muy similares es el ensayo de quimioluminiscencia, de Ciba Corning. Este procedimiento, automático en el ACS-180, emplea un marcador quimioluminiscente.

Otro procedimiento no radioisotópico de la vitamina B₁₂, es el ensayo de micropartícula del factor intrínseco (Tabla 39-5, método 4).[ref\(1663\)](#) Este procedimiento automático utiliza un ensayo competitivo de dos pasos (Abbott Diagnostics, Abbott Park, IL 60064). En este procedimiento una muestra se combina con un extracto que sirve para liberar la vitamina B₁₂ de las proteínas de unión séricas. A continuación, se agrega un ligando de vitamina B₁₂ en fase sólida (factor intrínseco) para unir la B₁₂ libre en la solución. Después de un período de incubación, se deposita una alícuota de la solución en una matriz de la celda de reacción. Cualquier micropartícula unida a la vitamina B₁₂ es capturada por las fibras de la matriz. Luego de un paso de lavado, se agrega un reactivo trazador, consistente de FA conjugada a la vitamina B₁ y se incuba. El paso final es el agregado de una cantidad en exceso de una solución del sustrato 4-metilumbeliferil fosfato. La cantidad del producto de reacción, metilumbeliferona, es inversamente proporcional a la cantidad de vitamina B₁₂ presente en la muestra.[ref\(1664\)](#)

Otro ensayo no radioisotópico usado en algunos laboratorios es el inmunoensayo del donador enzimático clonado (IDEC) (Tabla 39-5, método 5).[ref\(1665\)](#) Este ensayo utiliza la enzima β-galactosidasa, la cual ha sido preparada como dos fragmentos de enzima separados usando técnicas de DNA recombinante. La enzima activa se obtiene solamente cuando estos dos fragmentos de enzima se mezclan juntos. Un fragmento de enzima se prepara como un aceptor enzimático, y el otro se prepara como el donador de enzima. La molécula aceptora de enzima se conjuga a la vitamina B₁₂. La vitamina B₁₂ en la muestra del paciente compite con el conjugado vitamina B₁₂-donador enzimático por un número limitado de sitios de unión a la proteína (factor intrínseco porcino). La unión de la vitamina B₁₂, de la muestra, a la proteína que une al factor intrínseco permite que se formen más complejos de vitamina B₁₂-aceptor enzimático y donador enzimático. La concentración de la vitamina B₁₂ en la muestra del paciente es directamente proporcional a la cantidad de enzima formada. La actividad de la enzima se mide monitoreando la hidrólisis de clorofenol b-galactopiranosido a 550 nm.

Muestra

El suero o el plasma son muestras aceptadas; sin embargo, el plasma anticoagulado con heparina es inadecuado para su uso debido a su capacidad unión por la vitamina B₁₂. La alta concentración de fluoruro o ascorbato pueden destruir a la vitamina B₁₂, y deben evitarse. Las muestras deben tomarse de individuos en ayuno ya que la ingesta de alimento puede aumentar las concentraciones de vitamina B₁₂ en la sangre.

La vitamina B₁₂ es degradada después que se expone a la luz por períodos mayores de 24 horas.[ref\(1666\)](#) Si el análisis se demora, las muestras pueden almacenarse a 4° C por varios días o congelarse a -20C por varios meses sin pérdida apreciable. Las muestras no deben ser congeladas y descongeladas repetidamente.

Intervalo de referencia

Los intervalos de referencia para la vitamina B₁₂ son dependientes de la técnica de ensayo usada para su determinación y del tipo de preparación del factor intrínseco



empleada.[ref\(1667\)](#) Se ha reportado que el intervalo de referencia dado para un ensayo microbiológico usando *Euglena gracilis* como el organismo, es de 160 a 950 pg/mL (118 a 700 pmol/L).[ref\(1668\)](#) El intervalo de referencia para la vitamina B₁₂, determinado mediante un ensayo competitivo de separación magnética, es 199 a 732 pg/mL (147 a 542 pmol/L). La vitamina B₁₂ es mayor en los recién nacidos cuando se compara con los adultos y se ha encontrado que es más alta en los individuos de raza negra cuando se la compara con los de raza blanca.[ref\(1669\)](#)

Los pacientes que toman ciertas drogas o medicamentos pueden mostrar concentraciones reducidas de vitamina B₁₂ en el suero debido a la interferencia con la absorción de la vitamina. Los compuestos que muestran este efecto incluyen metotrexato, fenitoína, barbituratos, y anticonceptivos orales.

Agradecimientos

Los editores desean agradecer la versión previa del método del ácido fólico escrita por Micheal D. D. McNeely.

Referencias

1. Food and Nutrition Board: *Recommended Dietary Allowances*, ed 10, Washington, D.C., 1989, National Academy of Science.
2. Pesce AJ, Kaplan LA: *Methods in clinical chemistry*, St. Louis, 1987, Mosby.
3. Labbe RF, editor: *Clinics in laboratory medicine*, vol 1, Laboratory assessment of nutritional status, Philadelphia, 1981, Saunders.
4. Briggs MH, editor: *Vitamins in human biology and medicine*, Boca Raton, Fla., 1981, CRC Press.
5. Calabrese EJ: *Nutrition and environmental health*, vol 1, The vitamins, New York, 1980, Wiley & Sons.
6. Brewster MA, Naito HK, editors: *Nutritional elements and clinical biochemistry*, New York, 1980, Plenum Publishing.
7. Pereira GR, Zucker A: Nutritional deficiencies in the neonate, *Clin Perinatol* 13:175-189, 1986.
8. Rosenthal MJ, Goodwin JS: Cognitive effects of nutritional deficiency, *Adv Nutr Res* 7:71-100, 1985.
9. Snodgrass GR: Vitamin neurotoxicity, *Molec Neurobiol* 6:41-73, 1992.

Vitamina A

10. Garry PJ: Vitamin A. In Labbe RF, editor: *Clinics in laboratory medicine*, vol 1, *Laboratory assessment of nutritional status*, Philadelphia, 1981, Saunders.
11. Shamberger RJ: Vitamin A alterations in disease. In Brewster MA, Naito HK, editors: *Nutritional elements and clinical biochemistry*, New York, 1980, Plenum Publishing, pp 117-130.
12. Sklan D: Vitamin A in human nutrition, *Prog Food Nutr Sci* 11:39-55, 1987.
13. Underwood BA: Methods for assessment of vitamin A status, *J Nutr* 120(suppl 11):1459-1463, 1990.

Vitamina E

14. Bland J: Lipid antioxidant nutrition. In Brewster MA, Naito HK, editors: *Nutritional elements and clinical biochemistry*, New York, 1980, Plenum Publishing.



15. Sokol RJ, Guggenheim MA, Henbi JE, et al: Frequency and clinical progression of the vitamin E deficiency neurologic disorder in children with prolonged neonatal cholestasis, *Am J Dis Child* 139:1211-1215, 1985.
16. Farrell PM, Bieri JG: Megavitamin E supplementation in man, *Am J Clin Nutr* 28:1381, 1975.
17. Bieri JG, Evarts RP, Thorp S: Factors affecting the exchange of tocopherol between red cells and plasma, *Am J Clin Nutr* 30:686, 1977.
18. Ogumekan AO: Vitamin E deficiency and seizures in animals and man, *Can J Neurol Sci* 6:43-45, 1979.
19. Sokol RJ: Vitamin E and neurological deficits, *Adv Pediatr* 37:119-148, 1990.

Vitamina K

20. Suttie JW: Role of vitamin K in the synthesis of clotting factors. In Draper HH, editor: *Advances in nutritional research*, vol 1, New York, 1977, Plenum Publishing.
21. Hazell K, Baloch KH: Vitamin K deficiency in the elderly, *Gerontol Clin* 12:10-17, 1970.
22. Motohara K, Endo F, Matsuda I: Screening for late neonatal vitamin K deficiency by acarboxyprothrombin in dried blood spots, *Arch Dis Child* 62:370-375, 1987.

Vitamina D

23. Taylor CB, Peng S: Vitamin D\Mits excessive use in the U.S.A. In Brewster MA, Naito HK, editors: *Nutritional elements and clinical biochemistry*, New York, 1980, Plenum Publishing.
24. Holick MF: The use and interpretation of assays for vitamin D and its metabolites, *J Nutr* 120(suppl 11):1464-1469, 1990.

Ácido ascórbico

25. Sauberlich HE: Ascorbic acid. In Labbe RF, editor: *Clinics in laboratory medicine, vol 1, Laboratory assessment of nutritional status*, Philadelphia, 1981, Saunders.
26. Englard S, Seifter S: The biochemical functions of ascorbic acid, *Annu Rev Nutr* 6:265-304, 1986.
27. Mirvish SS: Effects of vitamins C and E on N-nitroso compound formation, carcinogenesis and cancer, *Cancer* 58:1842-1850, 1986.
28. Jacob RA: Assessment of human vitamin C status, *J Nutr* 120 (suppl 11):1480-1485, 1990.
29. Washko PW, Welch RW, Dhariwal KR, et al: Ascorbic acid and dehydroascorbic acid analyses in biological samples, *Anal Biochem* 204:1-14, 1992.

Riboflavina

30. Komindr S, Michaels GE: Clinical significance of riboflavin deficiency. In Brewster MA, Naito HK, editors: *Nutritional elements and clinical biochemistry*, New York, 1980, Plenum Publishing.
31. Bates CJ: Human riboflavin requirements and metabolic consequences of deficiency in men and animals, *World Rev Nutr Diet* 50:215-266, 1987.
32. Pinto J, Raiczuk GB, Huang YP, Rivlin RS: New approaches to the possible prevention of side effects of chemotherapy by nutrition, *Cancer* 58:1911-1924, 1986.

Pyridoxina

33. Vermaak WJ, Bernard HC, Potgieter GM, Theran HD: Vitamin B₆ and coronary artery disease: epidemiological observations and case studies, *Atherosclerosis* 63:235-238, 1987.
34. Shuster K, Bailey LB, Madan CS: Vitamin B₆ status of low-income adolescent and adult pregnant women and the condition of their infants at birth, *Am J Clin Nutr* 34:1731, 1981.
35. Leklem JE: Vitamin B₆: a status report, *J Nutr* 120(suppl 11):1503-1507, 1990.



Niacina

36. Wahlqvist ML: Effects on plasma cholesterol of nicotinic acid and its analogues. In Briggs MH, editor: *Vitamins in human biology and medicine*, Boca Raton, Fla., 1981, CRC Press.
37. Glueck CJ: Nonpharmacologic and pharmacologic alteration of high-density lipoprotein cholesterol: therapeutic approaches to prevention of atherosclerosis, *Am Heart J* 110:1107-1115, 1985.
38. Gentile S, Orzes N, Persico M, et al: Comparison of nicotinic acid- and caloric restriction-induced hyperbilirubinaemia in the diagnosis of Gilbert's syndrome, *J Hepatol* 1:537-543, 1985.

Tiamina

39. Flint DM, Prinsley DM: Vitamin status of the elderly. In Briggs MH, editor: *Vitamins in human biology and medicine*, Boca Raton, Fla., 1981, CRC Press.
40. Blass JP: Thiamin and the Wernicke-Korsakoff syndrome. In Briggs MH, editor: *Vitamins in human biology and medicine*, Boca Raton, Fla., 1981, CRC Press.
41. Poloni M, Mazzarello P, Patrini C, and Pinelli P: Inversion of T/TMP ratio in ALS: a specific finding? *Ital J Neurol Sci* 7:333-335, 1986.

Biotina

42. Roth KS, Allen L, Yang W, et al: Serum and urinary biotin levels during treatment of holocarboxylase synthetase deficiency, *Clin Chim Acta* 109:337, 1981.
43. Wolf B, Heard GS, Weissbecker KA, et al: Biotinidase deficiency: initial clinical features and rapid diagnosis, *Ann Neurol* 18:614-617, 1985.
44. Roth KS: Biotin in clinical medicine: a review, *Am J Clin Nutr* 34:1967, 1981.

Ácido pantoténico

45. Schwabedal PE, Pietrzik K, Wittkowski W: Pantothenic acid deficiency as a factor contributing to the development of hypertension, *Cardiology* 71(suppl 1):187-189, 1985.

Vitamina B₁₂ y ácido fólico

46. Steinkamp RC: Vitamin B₁₂ and folic acid: clinical and pathophysiological considerations. In Brewster MA, Naito HK, editors: *Nutritional elements and clinical biochemistry*, New York, 1980, Plenum Publishing.
47. Saxena S, Carmel R: Racial differences in vitamin B₁₂ levels in the United States, *Am J Clin Pathol* 88:85-87, 1987.
48. Ho CH, Chang HC, Yeh SF: Quantitation of urinary methylmalonic acid by gas chromatography mass spectrometry and its clinical applications, *Eur J Hematol* 38:80-84, 1987.
49. Infante-Rivard C, Krieger M, Bascon-Barre M, Rivard SE: Folate deficiency among institutionalized elderly: public health impact, *J Am Geriatr Soc* 34:211-214, 1986.
50. Bailey LB: Folate status assessment, *J Nutr* 120(suppl 11):1508-1511, 1990.
51. Ueland PM, Refsum H, Stabler SP, et al: Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications, *Clin Chem* 39:1764-1779, 1993.

Carnitina

52. Rebouche CJ: Carnitine function and requirements during the life cycle, *FASEB J* 6:3379-3386, 1992.
53. Marzo A, Cardace G, Monti N, et al: Chromatographic and non-chromatographic assay of l-carnitine family components, *J Chromatogr* 527:247-258, 1990.
54. Tanphaichitr V, Leelahagul P: Carnitine metabolism and human carnitine deficiency, *Nutrition* 9:246-254, 1993.



Vitaminas como antioxidantes

55. Roe CR, Millington DS, Kahler SG, et al: Carnitine homeostasis in the organic acidurias, *Prog Clin Biol Res* 321:383-402, 1990.
56. Bendich A: Physiological role of antioxidants in the immune system, *J Dairy Sci* 76:2789-2794, 1993.
57. Cheeseman KH, Slater TF: An introduction to free radical biochemistry, *Br Med Bull* 49:481-493, 1993.
58. Perera FP, Tang D, Grinberg-Funes RA, et al: Molecular epidemiology of lung cancer and the modulation of markers of chronic carcinogen exposure by chemopreventive agents, *J Cell Biochem*, suppl 17F:119-128, 1993.
59. Manson JE, Gaziano JM, Jonas MA, Hennekens CH: Antioxidants and cardiovascular disease: a review, *J Am Coll Nutr* 12:426-432, 1993.
60. Taylor A: Cataract: relationship between nutrition and oxidation, *J Am Coll Nutr* 12:138-146, 1993.
61. Farmer CJ, Abt AF: Determination of reduced ascorbic acid in small amounts of blood, *Proc Soc Exp Biol Med* 34:146-150, 1936.
62. Washko PW, Welch RW, Dhariwal KR, et al: Ascorbic acid and dehydroascorbic acid analyses in biological samples, *Anal Biochem* 204:1-14, 1992.
63. Zannoni V, Lynch M, Goldstein S, Sato P: A rapid micromethod for the determination of ascorbic acid in plasma and tissues, *Biochem Med* 11:41-48, 1974.
64. Omaye ST, Turnbull JD, Sauberlich HE: In: McCormick DB, Wright LD, editors: *Methods in enzymology*, New York, 1979, Academic Press, vol 62, pp 3-11.
65. Liu TZ, Chin N, Kiser MD, Bigler WN: Specific spectrophotometry of ascorbic acid in serum or plasma by use of ascorbate oxidase, *Clin Chem* 28:2225-2228, 1982.
66. Garry PJ, Owen GM, Lashley DW, Ford PC: Automated analysis of plasma and whole blood ascorbic acid, *Clin Biochem* 7:131-145, 1974.

Acido fólico

67. O'Broin S, Kelleher B: Microbiological assay on microtitre plates of folate in serum and red cells, *J Clin Pathol* 45(4):344-347, 1992.
68. Chitis J: The folate binding in milk, *Am J Clin Nutr* 20:1-4, 1967.
69. Givas JK, Gutcho S: pH dependence of the binding of folates to milk binder in radioassay of folates, *Clin Chem* 21:427-428, 1975.
70. Hoffbrand AV, Newcombe BFA, Mollin DL: Method of assay of red cell folate activity and the value of the assay as a test for folate deficiency, *J Clin Pathol* 19:17-28, 1966.
71. Hoffbrand AV, Newcombe BFA, Mollin DL: Method of assay of red cell folate activity and the value of the assay as a test for folate deficiency, *J Clin Pathol* 19:17-28, 1966.
72. Scott JM, Weir DG: Folate composition, synthesis and function in materials, *Clin Haematol* 5:547-568, 1976.
73. Hicks JM, Cook J, Godwin ID, Soldin SJ: Vitamin B₁₂ and folate: pediatric reference ranges, *Arch Pathol Lab Med* 117(7):704-706, 1993.

Vitamina B₁₂

74. Lee DSC, Griffiths BW: Human serum vitamin B₁₂ assay methods: a review, *Clin Biochem* 18:261-264, 1985.
75. Ross GIM: Vitamin B₁₂ assay in body fluids using *Euglena gracilis*, *J Clin Pathol* 5:250-256, 1952.
76. Shorb MS: Activity of vitamin B₁₂ for the growth of *Lactobacillus lactis*, *Science* 107:397-398, 1948.
77. Unavailable.
78. Unavailable.
79. Hunter SH, Provasoli L, Stokstad ELR, et al.: Assay of anti-pernicious anemia factor with *Euglena*, *Proc Soc Exp Biol Med* 70:118-120, 1949.



80. Hunter SH, Provasoli L, Filfus J: Nutrition of some phagotropic fresh-water chrysomonads, *Ann NY Acad Sci* 56:852-862, 1953.
81. Allen RH: More on no-boil assay, *The Ligand Quarterly* 5:48-49, 1982.
82. Allen RH: *Current status of serum cobalamin (vitamin B₁₂) assays*, syllabus, seventh annual meeting, Clinical Radioassay Society, pp 85-109, Apr 27-May 1, 1981.
83. Kuemmerle SC, Boltinghous GL, Delby SM, et al: Automated assay of vitamin B₁₂ by the Abbott IMX Analyzer, *Clin Chem* 38(10):2073-2077, 1992.
84. van der Weide J, Homan HC, Cozijnsen-van Rheenen E, et al: Nonisotopic binding assay for measuring vitamin B₁₂ and folate in serum, *Clin Chem* 38(5):766-768, 1992.
85. Mastropaolo W, Wilson MA: Effect of light on serum B₁₂ and folate stability, *Clin Chem* 39(5):913, 1993.
86. Chen I-W, Silberstein EB, Maxon HR, et al: Clinical significance of serum vitamin B₁₂ measured by radioassay using pure intrinsic factor, *J Nucl Med* 22:447-451, 1981.
87. Reynoso G, Fontelo P, Konopka S, et al: Ligand assay methods for serum cobalamin, *The Ligand Quarterly* 3:34-40, 1980.
88. Chen I-W, Silberstein EB, Heninger LA, et al: Comparison of the serum vitamin B₁₂ (B₁₂), Unsaturated B₁₂ binding capacity (UBBC), and folate levels in white and black subjects, *Clin Chem* 32:1186, 1986.

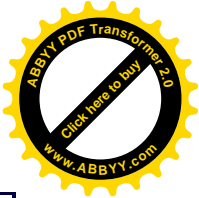
Tablas

Tabla 39-1. Funciones de las vitaminas y síntomas de deficiencia o toxicidad.

Vitamina:	A
Función:	Visión, crecimiento, secreción de mucosa, respuestas inmune, prevención del cáncer (?)
Deficiencia clínicos:	Ceguera nocturna, retardo del crecimiento, pérdida del apetito, sabor reducido, infecciones recurrentes, dermatitis, membranas de la mucosa secas. <i>Tarde:</i> falla del crecimiento óseo, espermatogénesis, xeroftalmia (lóbulos oculares secos, gruesos y sin brillo).
Toxicidad:	<i>Aguda:</i> presión intracraniana aumentada y descamación de la piel; teratógeno. <i>Crónica:</i> daño del hígado, cambios en la piel, y exostosis.
Vitamina:	E
Función:	Antioxidante (estabilidad de membrana), función neurológica, prevención de la enfermedad cardiovascular.
Deficiencia clínicos:	Anemia hemolítica benigna, ataxia, pérdida de los reflejos del tendón, retinopatía pigmentaria.
Toxicidad:	Creatinuria, agregación plaquetaria disminuida, cicatrización de heridas alterada, actividad antiinflamatoria, fibrinólisis afectada, potenciación de la deficiencia de vitamina K, coagulopatía.



Vitamina:	K
Función:	Coagulación (carboxilación gama de los factores de coagulación inactivos - protrombina, factores II, IX y X)
Deficiencia clínicos:	Hemorragia (variando desde el machucado hasta equimosis masiva, hemorragia de la membrana mucosa, o sangrado postraumático)
Toxicidad:	Adultos: signos cardíacos y pulmonares. Recién nacidos: anemia hemolítica.
Vitamina:	D
Función:	Calcificación ósea
Deficiencia clínicos:	Niños: raquitismo Adultos: osteomalacia
Toxicidad:	Anorexia, vómitos, dolor de cabeza, somnolencia, diarrea.
Vitamina:	C
Función:	Formación de colágeno, síntesis de catecolaminas, catabolismo del colesterol, antioxidante.
Deficiencia clínicos:	Primero: debilidad, lasitud, irritabilidad, dolores y aflicciones vagos. Tarde: escorbuto (hemorragias en la piel, en los tractos digestivos y urinario, en otros tejidos; huesos osteoporósicos, formación defectuosa de dientes, anemia, pirexia, cicatrización retardada de heridas.
Toxicidad:	Excreción aumentada de oxalato y urato, diarrea, dispepsia.
Vitamina:	Riboflavina
Función:	Reacciones enzimáticas de óxido-reducción.
Deficiencia clínicos:	Estomatitis angular (lesiones bucales), glositis (lengua lisa), fotofobia, blefaroespasma, espasmo del párpado del ojo, congestión conjuntival y otros cambios oculares, alteraciones neurológicas (cambios de comportamiento, fuerza disminuida del puño de la mano, pies hirviendo en los adultos, desarrollo intelectual retardado y cambios en el EEG en los niños), y discrasia hematológica (anemia y reticulocitopenia).
Toxicidad:	Baja toxicidad
Vitamina:	Piridoxina
Función:	Sistemas enzimáticos que involucran las aminoácido transaminasas, fosforilasas, racemasas, decarboxilasas, deaminasas.
Deficiencia clínicos:	Niños: irritabilidad, ataques, anemia, vómitos, debilidad, ataxia, dolor abdominal. Adultos: seborrea facial
Toxicidad:	Generalmente toxicidad sistémica baja.



Producción de leche disminuida? Neuropatía sensorial (?)	
Vitamina:	Niacina
Función:	Oxidación-reducción (como nucleótidos de piridina NAD y NADP)
Deficiencia clínicos:	Primero: lasitud, anorexia, debilidad, disturbios digestivos, ansiedad, irritabilidad y depresión. Tarde: pelagra (dermatitis, inflamación de las membranas de la mucosa, pérdida de peso, desorientación, delirio, demencia).
Toxicidad:	Rubor de la piel, irritación gástrica, disfunción moderada del hígado, ictericia, heperuricemia, tolerancia empeorada de la glucosa.
Vitamina:	Tiamina
Función:	Descarboxilaciones, formación de cetoles.
Deficiencia clínicos:	Niños: dipnea y cianosis, diarrea, vómitos, pérdidas, afonía. Adultos: "beriberi seco" (poco apetito, fatiga, neuritis periférica) o "beriberi húmedo" (edema o falla cardíaca), síndrome de Wernicke-Korsakoff (disturbio de la inteligencia, apatía, ataxia, visión doble, nistagmo, párpados caídos, pérdida reciente de memoria).
Toxicidad:	Ansiedad, dolor de cabeza, convulsiones, debilidad, temblor, colapso neuromuscular.
Vitamina:	Biotina
Función:	Coenzima para las reacciones de carboxilación con CO ₂ y por intercambio de grupo carboxilo.
Deficiencia clínicos:	Dermatitis progresando hasta cambios neurológicos y mentales, náusea, anorexia, vasoconstricción o isquemia coronaria en algunos casos.
Toxicidad:	No descrita
Vitamina:	Pantotenato
Función:	Reacciones de transferencia de grupo acilo (como parte de la coenzima A y de la proteína portadora de acilos).
Deficiencia clínicos:	Nunca vista espontáneamente – con agonista química: apatía, depresión, infección aumentada, parestesias (sensación de quemadura), debilidad muscular.
Toxicidad:	No descrita
Vitamina:	B ₁₂
Función:	Formación de mielina, síntesis de metionina, interconversiones del folato, y síntesis de DNA.
Deficiencia clínicos:	Primero: empeoramiento cognoscitivo? Tarde: anemias megaloblásticas,



Toxicidad:	anormalidades neurológicas (parestias progresando hasta ataxia espática). Reacciones adversas no frecuentes, en su mayor parte alérgicas (posiblemente relacionadas con contaminantes o conservantes).
Vitamina:	Folato
Función:	Transferencias de un carbono
Deficiencia clínicos:	Anemia megaloblástica; cambios mentales orgánicos?
Toxicidad:	Pocos casos – en su mayoría reacciones alérgicas.
Vitamina:	Carnitina
Función:	Metabolismo energético y de transporte del grupo acilo.
Deficiencia clínicos:	Debilidad muscular, fatiga.
Toxicidad:	Desconocida.

Tabla 39-2. Concentración o velocidades de excreción asociadas con los clásicos síntomas de deficiencia vitamínica.* •

Vitamina	Valor químico
A	< 0.1 mg/L de retinol plasmático > 20% respuesta de dosis relativa (RDR) en el plasma.
E	< 5.0 mg/L de α -tocoferol plasmático.
K	Tiempo de protrombina plasmática mayor que el normal.
D	Ver Capítulo 28
Acido ascórbico (C)	< 2.4 mg/L de ascorbato sérico < 3 mg/L de ascorbato sanguíneo total < 80 mg/L de ascorbato leucocitario
Riboflavina (B ₂)	> 1.4 AC de glutatión reductasa leucocitaria < 0.1 mg de riboflavina por litro de eritrocitos < 0.12 mg de riboflavina urinaria por día ≥ 0.08 mg de riboflavina urinaria por gramo de creatinina
Piridoxina (B ₆)	≥ 1.5 AC de ASAT eritrocitaria ≥ 1.25 AC de ALAT eritrocitaria < 0.8 mg de ácido 4-piridóxico urinario por día > 25 mg de ácido xanturénico urinario por día

	< 30 nM de fosfato de piridoxal plasmático
Tiamina	< 1.25 AC de transcetolasa eritrocitaria
	< 0.1 mg de tiamina urinaria por día
Niacina	≥ 1 de proporción urinaria (α- piridona/ N'-metilnicotinamida)
Biotina§	< 0.7 (g/L de la sangre total?
	15 µg de biotina urinaria por día?
Acido pantoténico§	< 1.0 mg/L del pantotenato total sanguíneo
	< 1.0 mg del pantotenato urinario por día
B ₁₂	<150 ng/L de vitamina B ₁₂ sérica
	> 24 mg de ácido metilmalónico urinario por día
	> 0.44 nM de ácido metilmalónico sérico
	> 4 mmol/mol de creatinina en la orina
	> 15 nM de homocisteína sérica total
Folato	< 140 (g/L de folato eritrocitario
	< 3.0 (g/L de folato sérico
	≥ 30 mg de ácido N ⁵ -formininoglutámico (FIGLU) durante 8 horas
	> 15 nM homocisteína sérica
Carnitina	< 30 nM de la carnitina plasmático total
<p>*Estas son guías generales con intervalos de referencia dependientes de la edad y de la metodología usada.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Recogidos de las referencias 3, 4 y 42. refs(1670) <p>**AC, Coeficiente de actividad; relación de actividades con y sin agregado de cofactor.</p> <p>§ Los valores deficientes para biotina y pantotenato no han sido bien establecidos.</p>	

Tabla 39-3. Métodos de análisis del ácido ascórbico.

Método:	1. Espectrofotometría
	2,4dinitrofenilhidrazina
Principio:	El ácido ascórbico es oxidado por el cobre a ácido dehidroascórbico y ácido 2,3 dicetoglucónico. El agregado de 2,4-dinitrofenilhidrazina seguido por ácido sulfúrico resulta en la formación de fenilhidrazona coloreada
Uso:	El método más comunmente usado
Comentarios:	Sujeto a interferencia por azúcares, aminoácidos, tiosulfatos y ácido glucorónico.
Método:	2. Enzimático
Principio:	El ácido ascórbico es oxidado a ácido dehidroascórbico por la ácido ascórbico oxidasa. El agregado de ion férrico y 2,4,6-tris (2-piridil-S-triazina) resulta en la formación de un compuesto coloreado medido a 593 nm



Uso:	No es usado comunmente
Comentarios:	Más específico que el método 1
Método:	3. Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)
Principio:	Separación de ácido ascórbico y de ácido dehidroascórbico usando columnas de octadecilsilil (C_{18}) con detección ultravioleta o electroquímica
Uso:	Usado con gran frecuencia
Comentarios:	Más sensible y específico que los otros métodos

Tabla 39-4. Métodos de análisis de folato.

Método:	1. Microbiológico
Principio:	Crecimiento del organismo que requiere folato proporcional a la cantidad de folato presente en el paciente
Uso:	Raramente usado
Comentarios:	Método de referencia
Método:	2. Radiométrico
Principio:	El folato en las muestras compete con el folato radiomarcado por los sitios de unión a la proteína de la leche
Uso:	Más frecuentemente usado
Comentarios:	Los fijadores de folato endógeno deben ser eliminados
Método:	3. No-radioisotópicos
Principio:	El folato en la muestra compete con el folato marcado por unión a la proteína fijadora de folato. La cantidad de conjugados de folato marcado unidos a la proteína fijadora es inversamente proporcional al folato del paciente
Uso:	Cada vez más usado
Comentarios:	Los fijadores de folato endógeno deben ser destruidos Automático

Tabla 39-5. Métodos de análisis de vitamina B_{12} .

Método:	1. Microbiológico
Principio de análisis:	El crecimiento del microorganismo en



Uso:	solución depende de la cantidad de Vitamina B ₁₂ presente en la muestra de suero; el crecimiento es monitoreado por turbidimetría	
Comentarios:	No es de uso rutinario Usado como referencia Tedioso No es muy sensible	
Método:	2. Radioinmunoensayo	
Principio de análisis:	La competencia ocurre entre la B ₁₂ radiomarcada y la B ₁₂ no marcada del suero del paciente por un número limitado de sitios en un fijador de vitamina B ₁₂ a la proteína	
Uso:	Más común, corrientemente en uso. Podrá ser probablemente reemplazado por ensayos	
Comentarios:	Sensible y preciso A menudo realizado con el análisis de ácido fólico	
Método:	3. Inmunoensayo por separación-magnética competitiva	
Principio de análisis:	La vitamina-B ₁₂ -ligada a la enzima (FAL) compite con la vitamina B ₁₂ del suero de pacientes por un número limitado de sitios de unión a la proteína fijadora de vitamina B ₁₂	
Uso:	Usado frecuentemente	
Comentarios:	Método recientemente introducido	
Método:	4. Ensayo de factor intrínseco microparticular	
Principio de análisis:	B ₁₂ de la muestra del paciente se liga a micropartículas en fase sólida La B ₁₂ del suero compite con la B ₁₂ fijada a la enzima para unirse a la micropartícula	
Uso:	Frecuentemente usado Método recientemente introducido.	
Método:	5. Inmunoensayo donador de enzima clonada (IDEC)	
Principio de análisis:	La B ₁₂ endógena compite con la B ₁₂ ligada a la molécula aceptora enzimática por un número limitado de sitios fijadores de factor intrínseco. La B ₁₂ endógena permite que un gran número de moléculas donadoras y receptoras de enzimas se asocien para formar la enzima activa	
Uso:	Frecuentemente usado	

Comentarios: Método recientemente introducido

FAL, Fosfatasa alcalina

Figuras

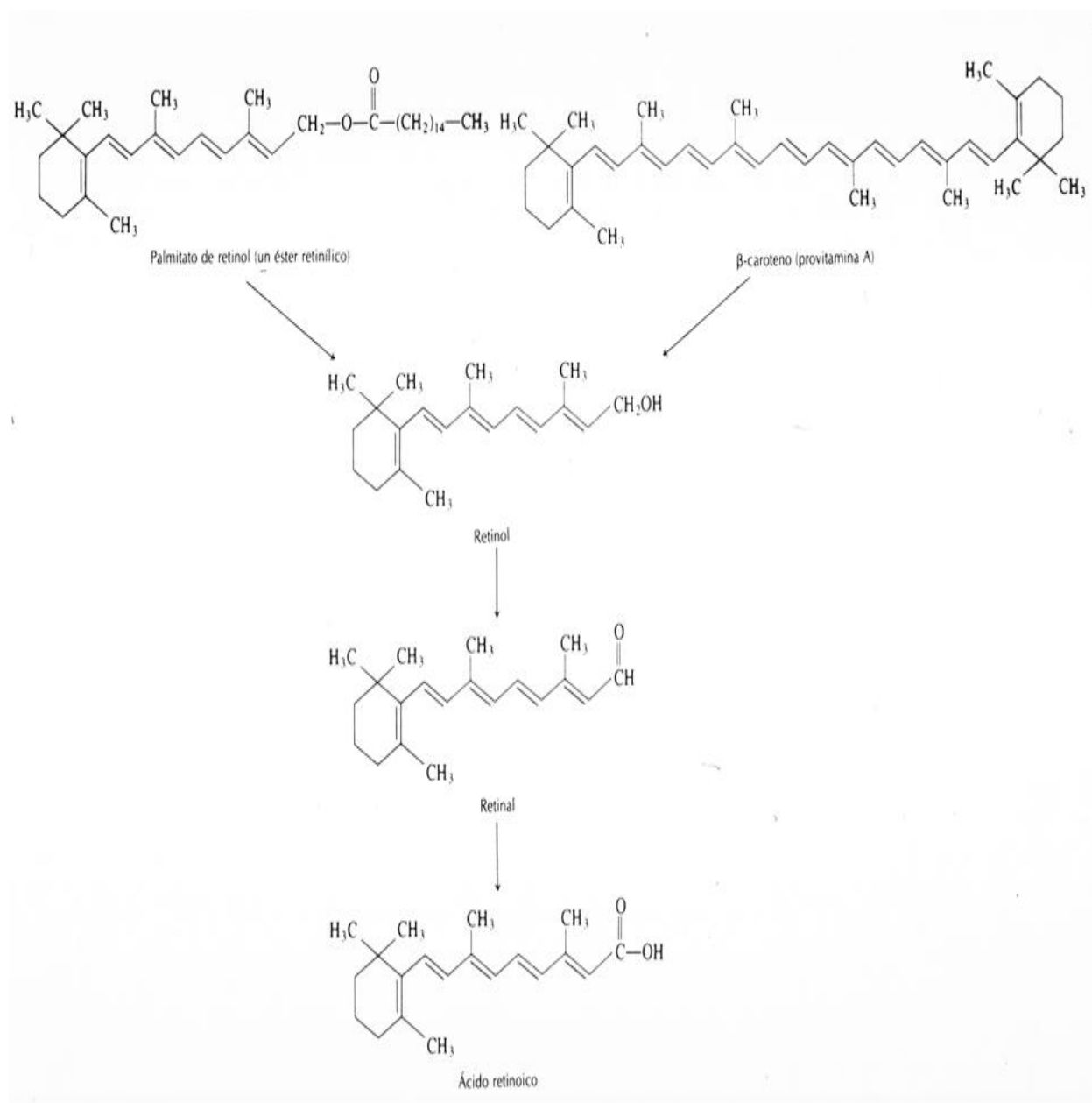


Figura 39-1 Estructuras de la vitamina A (retinol) con sus precursores y metabolitos.

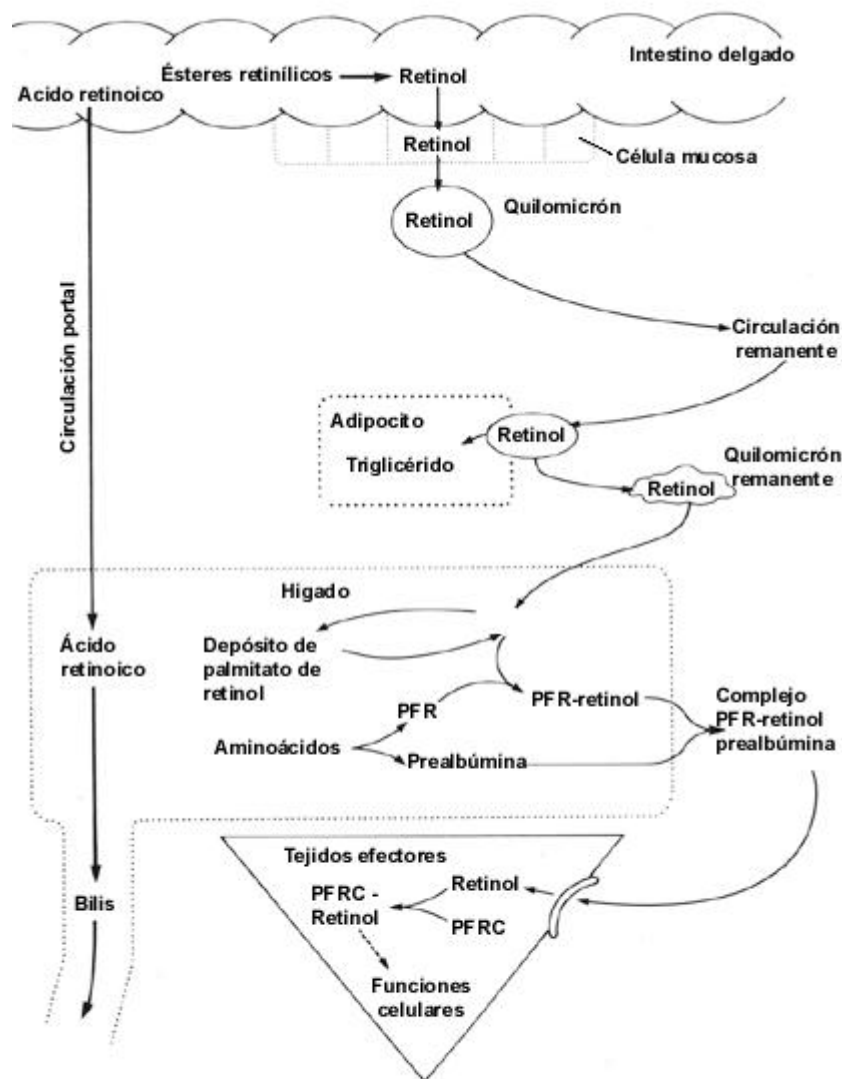


Figura 39-2 Metabolismo del retinol. PFR, Proteína fijadora de retinol; PFRC, Proteína fijadora de retinol celular.

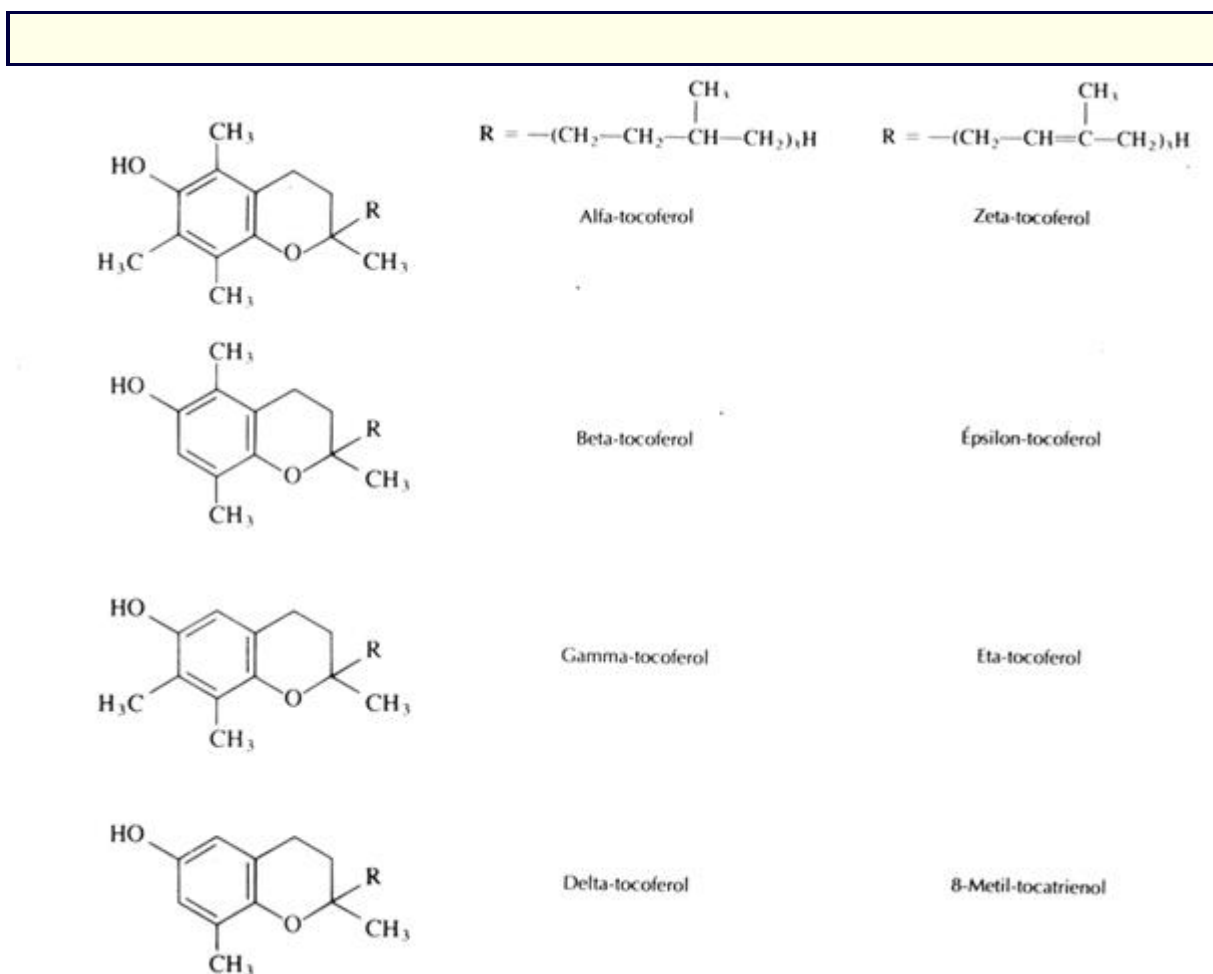


Figura 39-3 Isómeros de la vitamina E. La estructura en la columna de la izquierda es la del anillo central del isómero. Los grupos R en la segunda o tercera columnas corresponden a las dos formas que pueden formar parte en la estructura. De esta manera se describen las ocho formas de la vitamina.

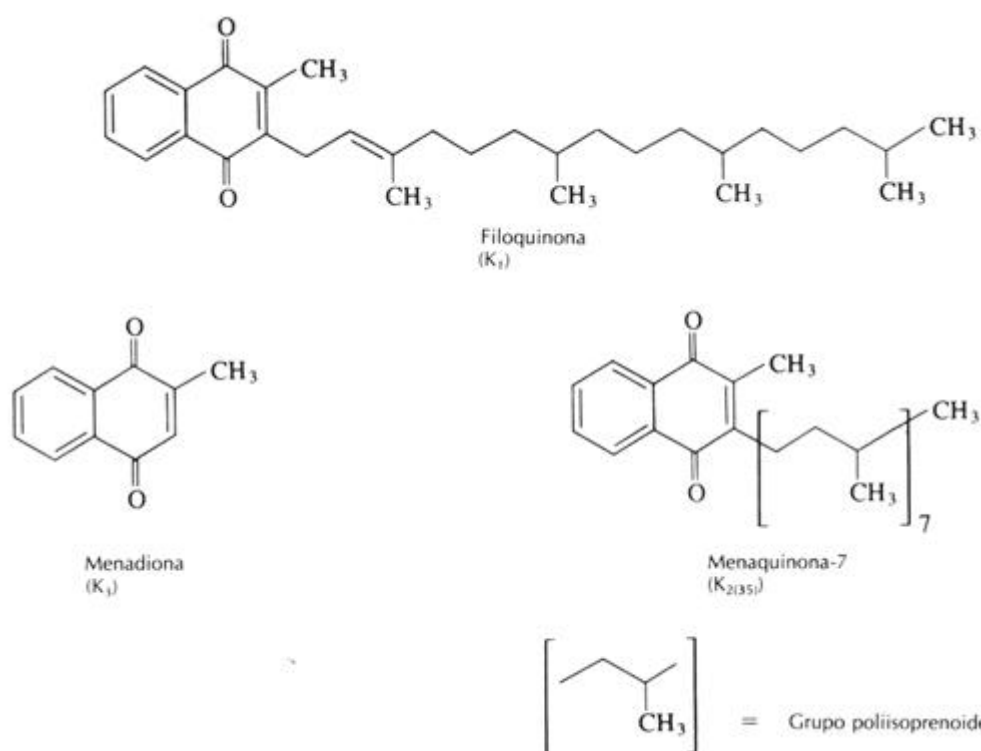


Figura 39-4 Estructuras de las formas de vitamina K.

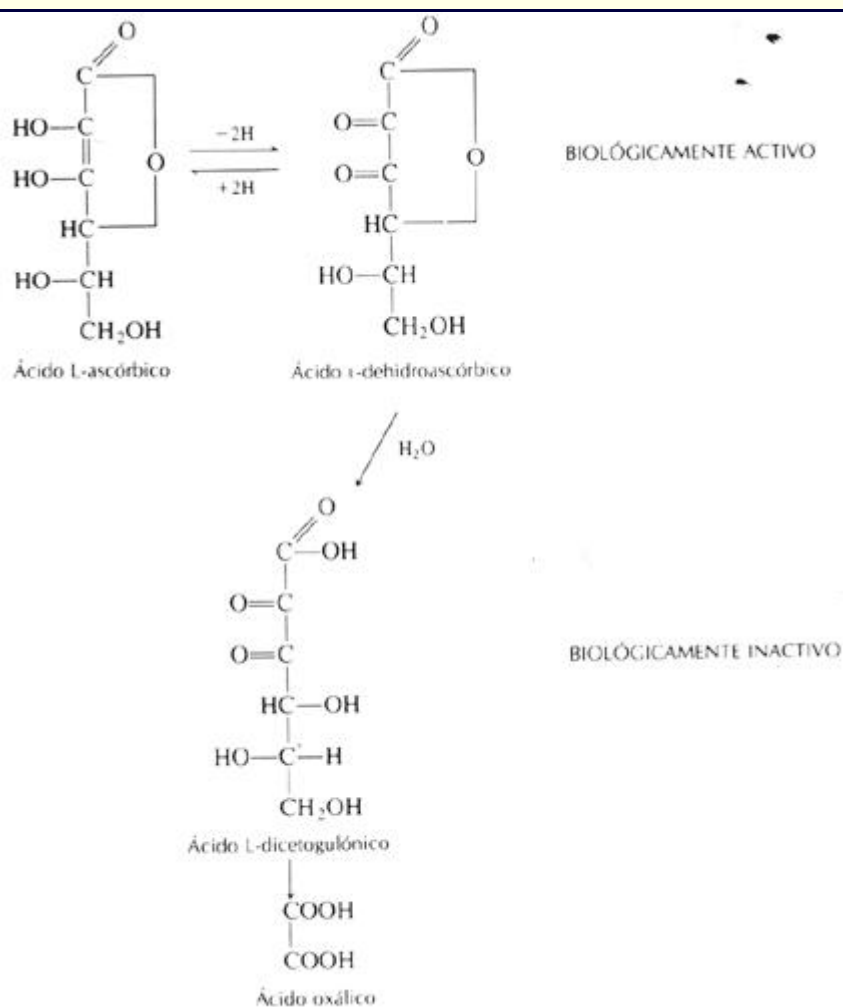


Figura 39-5 Estructuras del ácido ascórbico y sus metabolitos.

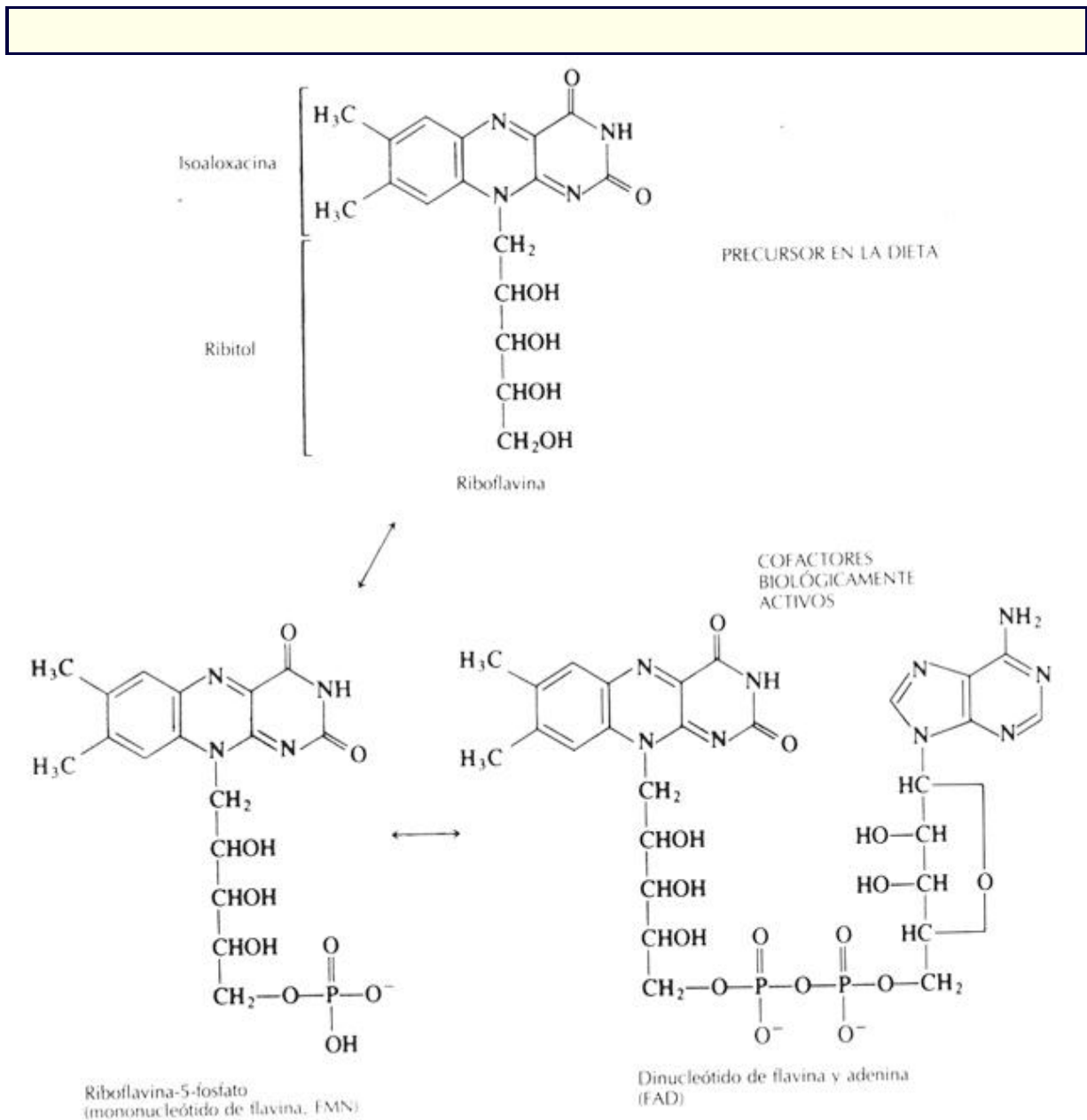


Figura 39-6 Riboflavina y sus formas de cofactores activos

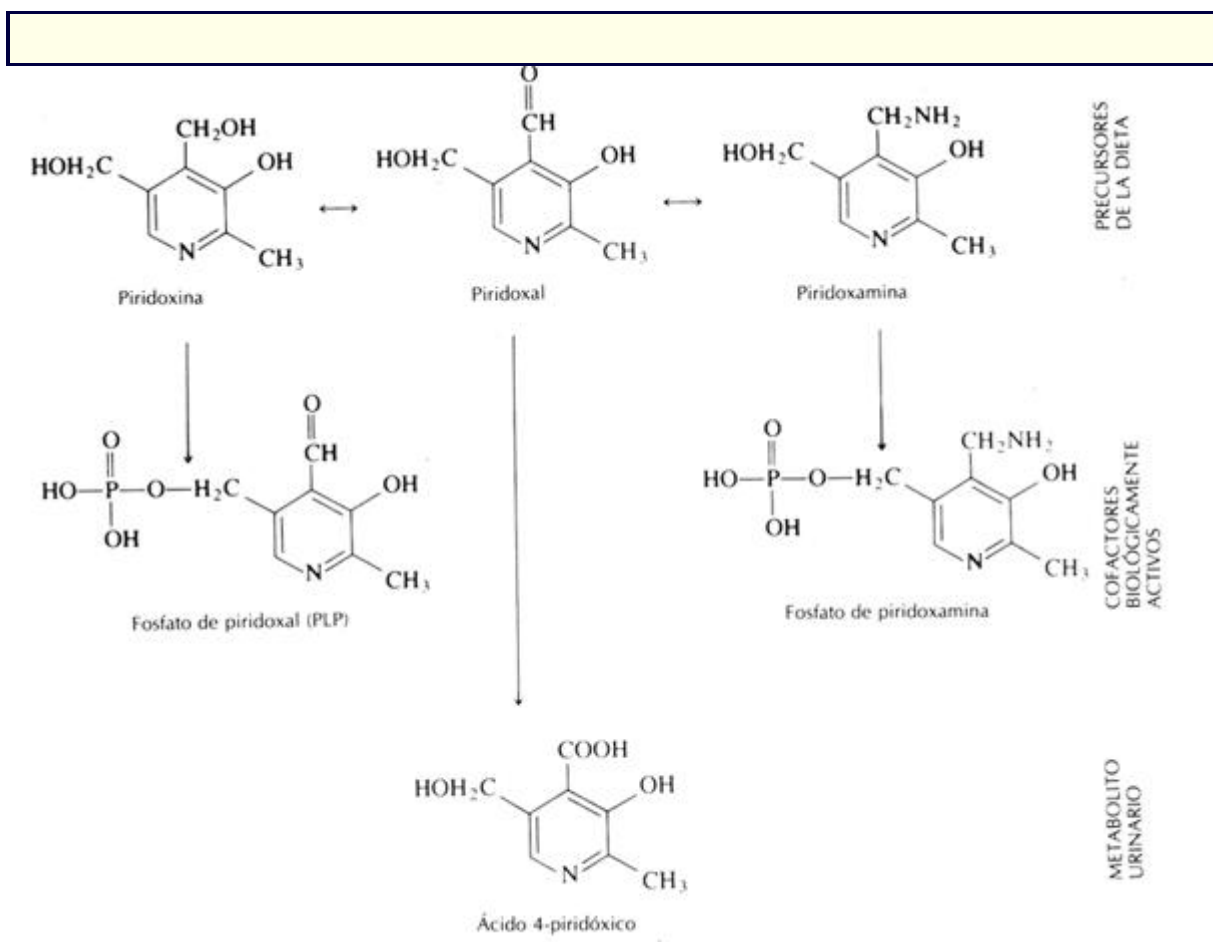


Figura 39-7 Formas y metabolitos principales de la vitamina B₆. PLP, fosfato de piridoxal.

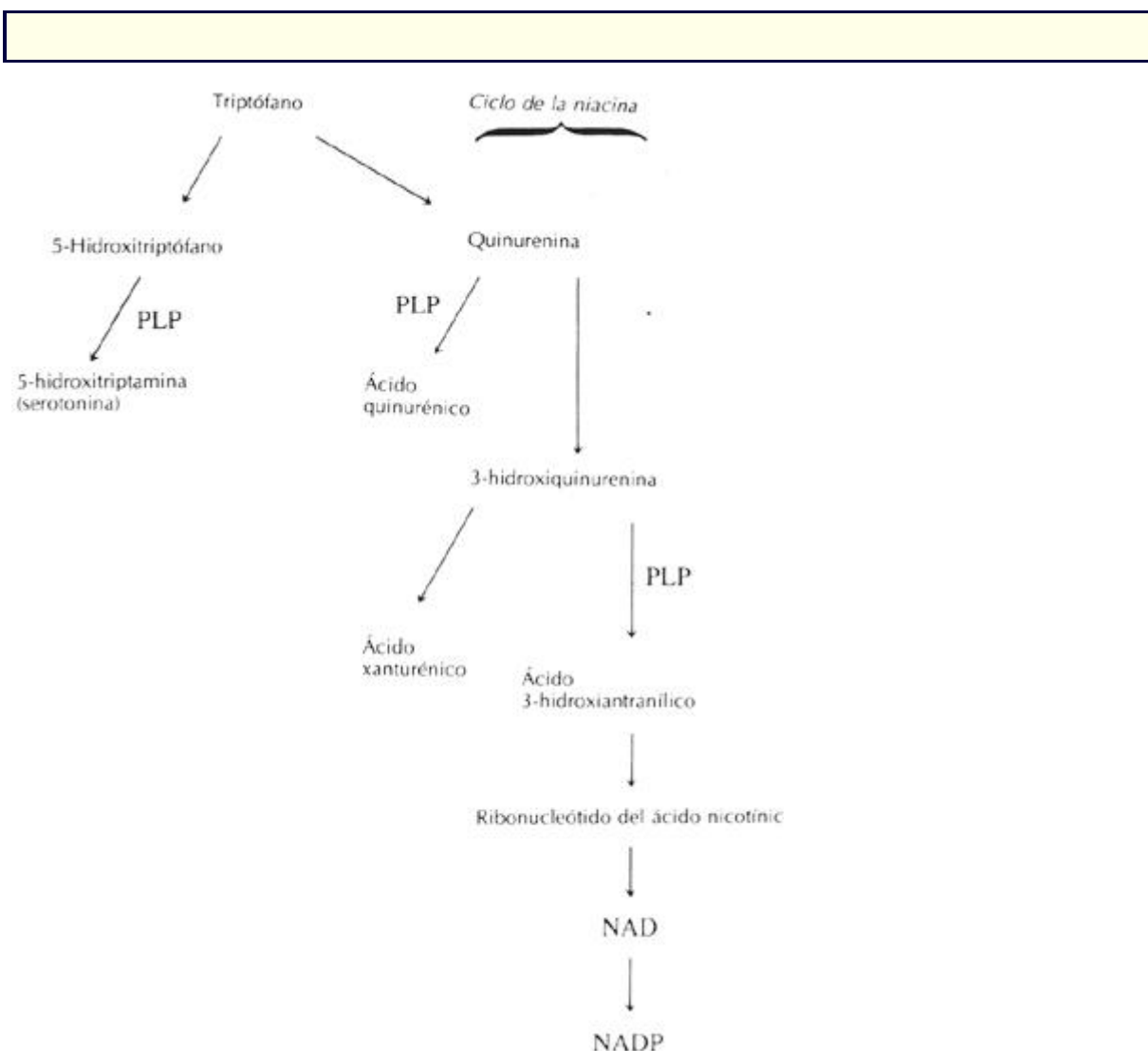


Figura 39-8 Papel de la vitamina B₆ en el metabolismo del triptófano. *NAD*, Nicotinamina adenín dinucleótido; *NADP*, nicotinamina adenín dinucleótido fosfato; *PLP*, fosfato de piridoxal.

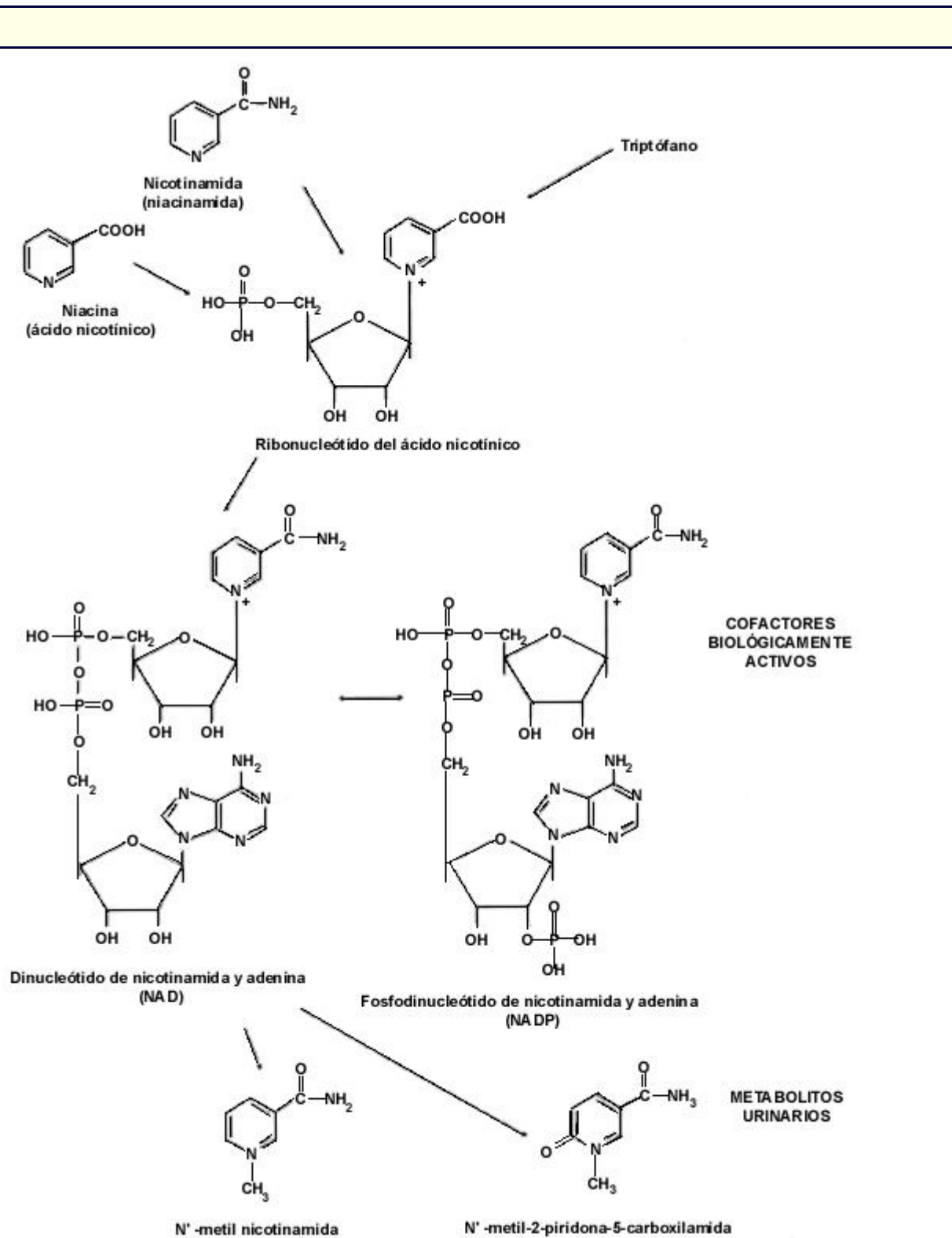


Figura 39-9 Papel desempeñado por la citamina B6 en el metabolismo del triptofano. *NAD*, dinucleótido de nicotinamida adenín dinucleotido; *NADP*, nicotinamida adenín dinucleótido fosfato; *PLP*, fosfato de piridoxal.

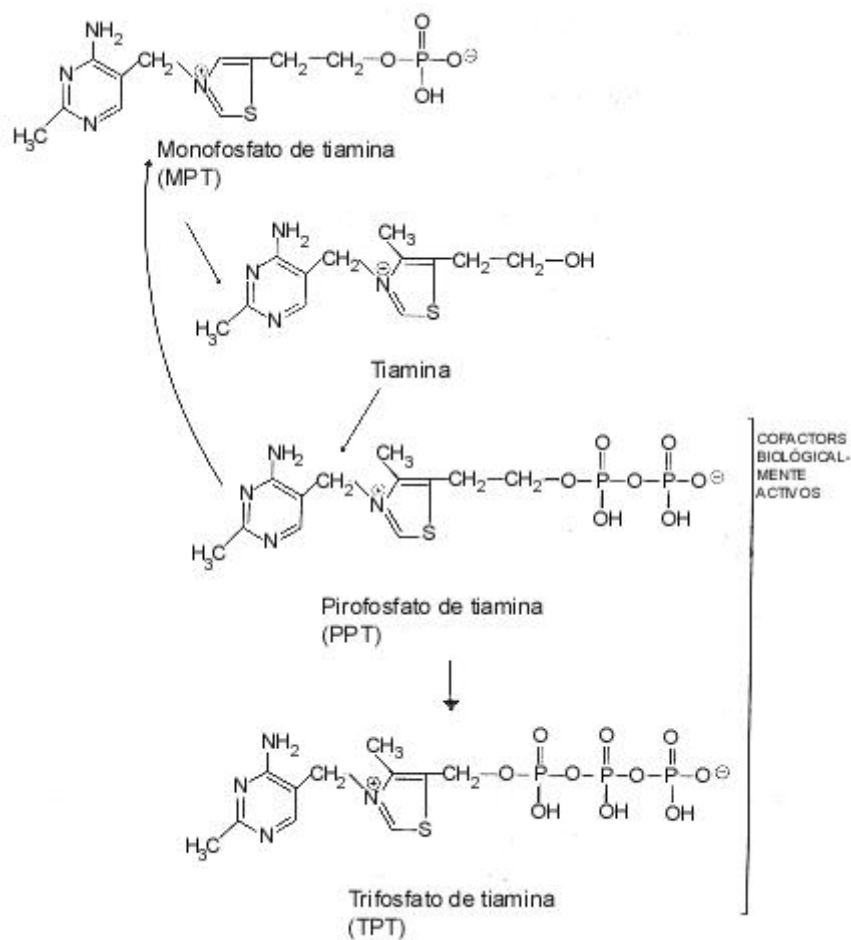


Figure 39-10 La tiamina y sus formas de cofactor.

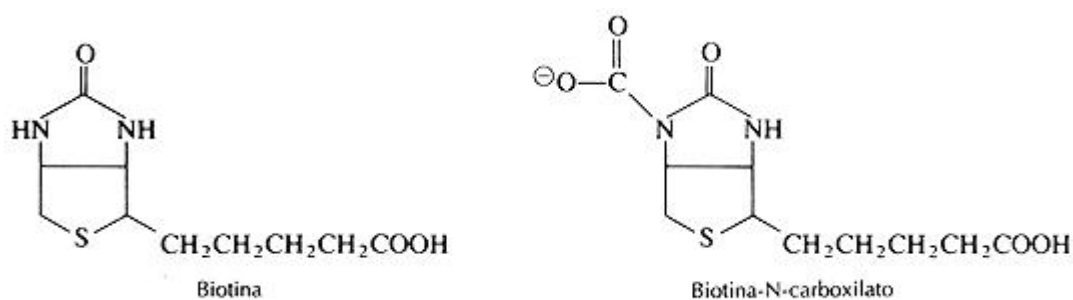


Figura 39-11 Biotina y su forma activa.

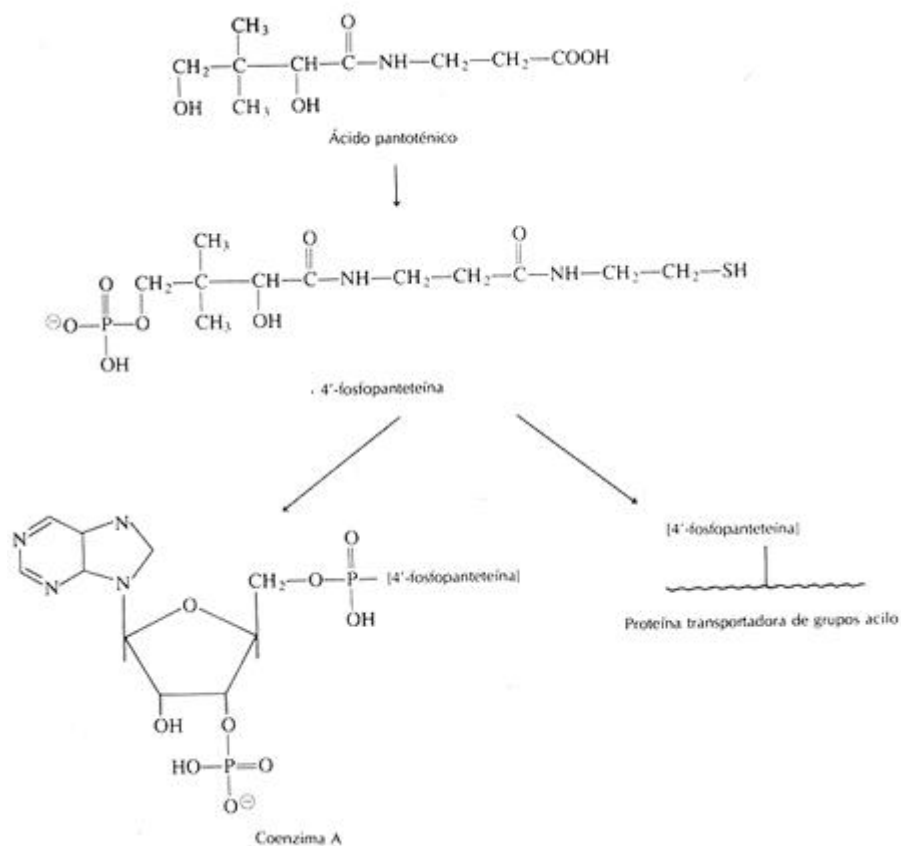
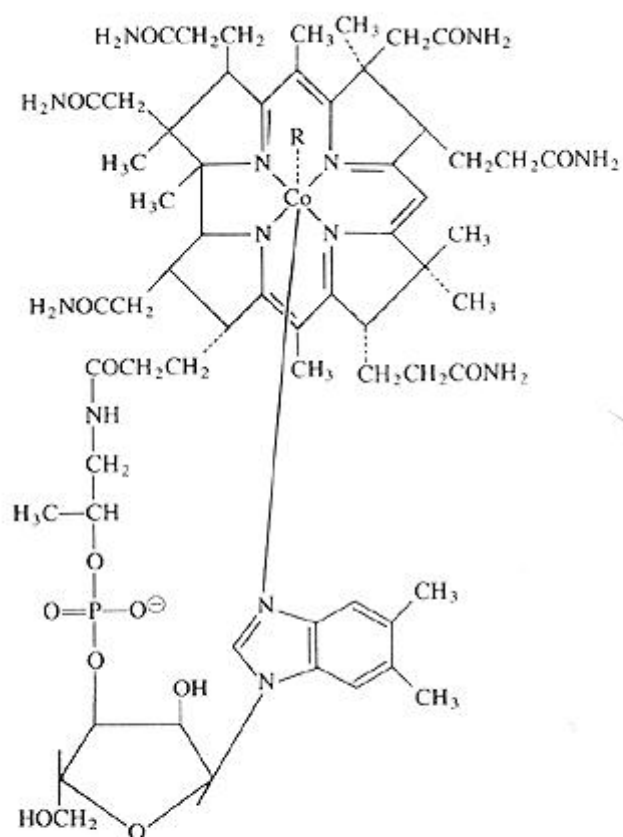


Figura 39-12 Ácido pantoténico y sus cofactores activos.

Vitaminas



	R		
(Me-B ₁₂)	CH ₃	Metilcobalamina	FORMAS ACTIVAS COMO COFACTORES
(Ado-B ₁₂)	5'-desoxia- denosina	Desoxiadensil- cobalamina	
(OH-B ₁₂)	OH	hidroxicobalamina	FORMAS DIETÉTICAS Y TERAPÉUTICAS
(CN-B ₁₂)	CN	Cianocobalamina	

Figura 39-13 Formas de la Vitamina B₁₂

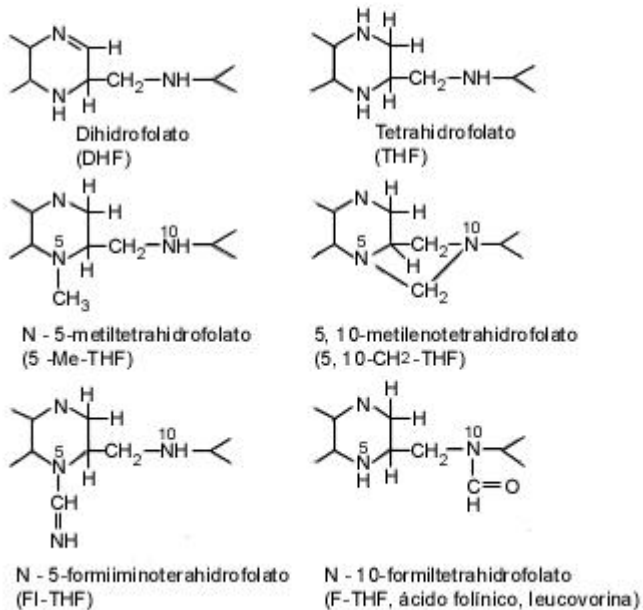
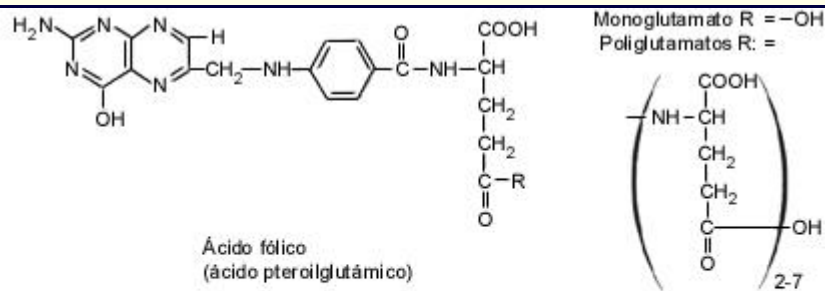


Figura 39-14 Estructuras de las formas del ácido fólico.

OH-cbl: cblin de la dieta

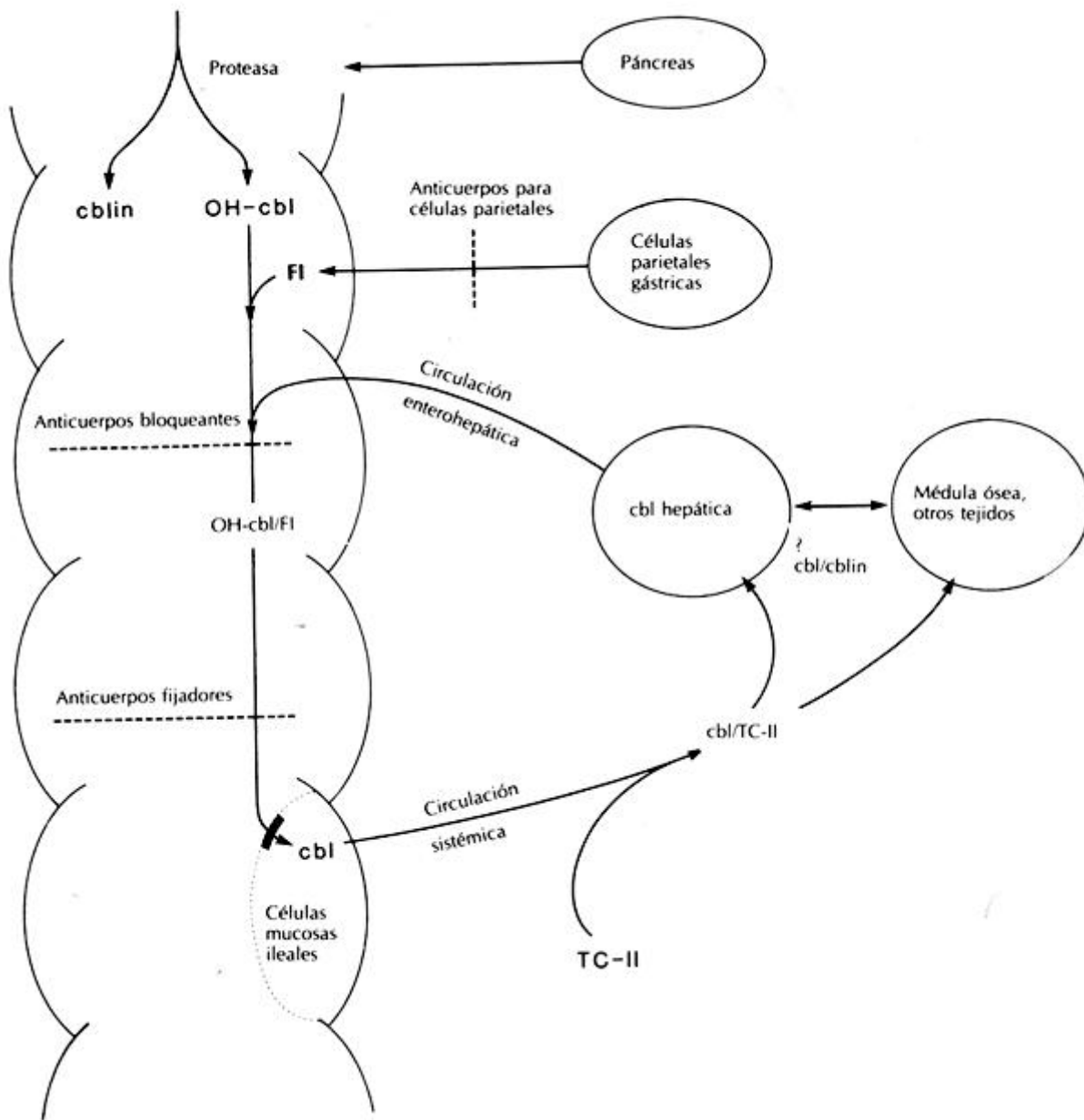
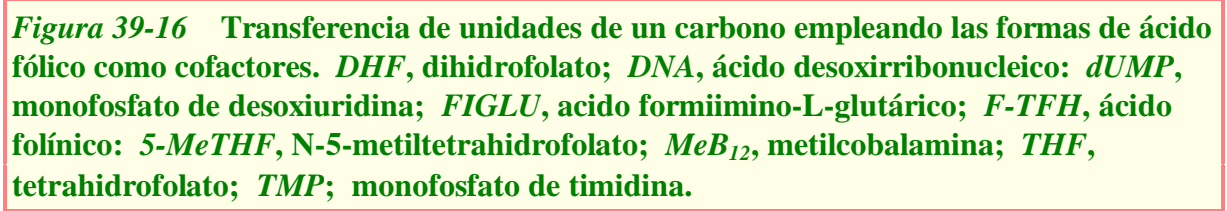
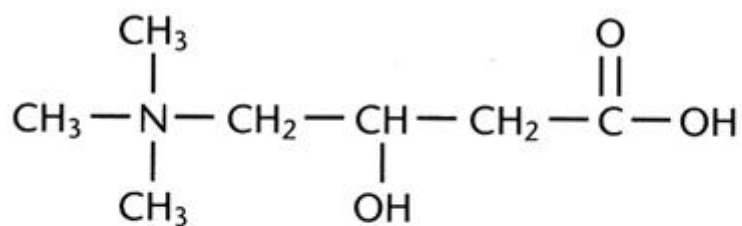
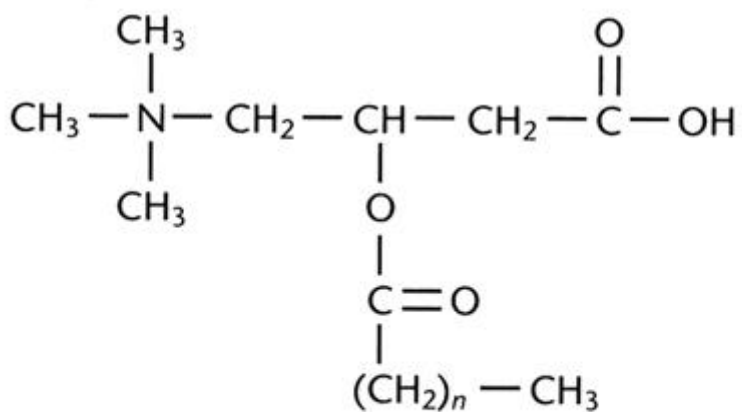


Figura 39-15 Absorción de la vitamina B₁₂ proveniente de la dieta y su transporte en los sitios de almacenamiento. *cblin*, Cobalofilina; *cbl*, cobalamina; *IF*, factor intrínseco; *OH-cbl*, hidroxicobalamina; *TC II*, transcobalamina II.





L-Carnitina



Acilcarnitina

Figura 39-17 L-carnitina y los ésteres de ácidos grasos.

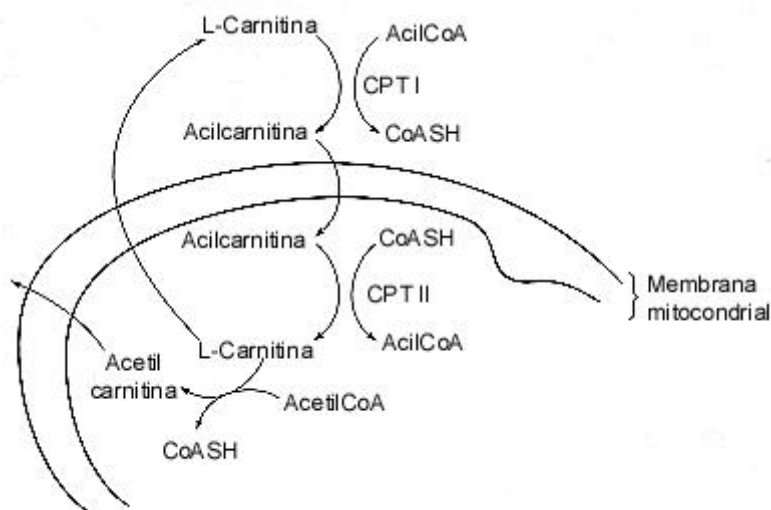


Figure 39-18 Transporte de los grupos acilo por medio de la carnitina.



CAPÍTULO 40

40. Embarazo y Desarrollo Fetal

John F. Chapman and Gregory J. Tsongalis

Interacciones anatómicas y fisiológicas entre la madre y el feto

- Fertilización e implantación del óvulo
- Desarrollo y nutrición del feto
- Papel de la placenta en el intercambio gaseoso
- Formación del líquido amniótico

Bioquímica del líquido amniótico

- Agua, electrolitos y productos nitrogenados
- Proteínas
- Hormonas

Alteraciones bioquímicas maternas durante el embarazo

- Gonadotropina coriónica humana
- Estrógenos
- Tiroides
- Lípidos séricos
- Proteínas séricas y función hepática
- Glucosuria

Alteraciones bioquímicas fetales durante el desarrollo prenatal

- Función hepática
- Función renal
- Desarrollo pulmonar
- Hemoglobina
- Bilirrubina

Condiciones patológicas asociadas con el embarazo y el período perinatal

- Trastornos placentarios
- Inmadurez pulmonar fetal
- Trastornos hemolíticos fetales (problemas con el Rh)
- Diabetes materna
- Toxemia (enfermedad hipertensiva del embarazo)
- Espina bífida y anencefalia
- Síndrome de Down
- Embarazo tubario



Alteraciones bioquímicas en estados patológicos

Gonadotropina coriónica humana
Lactógeno placentario humano
Estríol
Pruebas de la maduración pulmonar fetal
Bilirrubina (ΔA_{450})
Glucosa
Pruebas de la función renal
 α - Fetoproteína
Magnesio

Métodos de análisis

Bilirrubina en líquido amniótico
Evaluación de la madurez pulmonar fetal: Análisis del líquido amniótico
Relación entre lecitina y esfingomielina
Fosfatidil glicerol
Gonadotropina coriónica humana-(β -GCH)

OBJECTIVOS

- ♦ Describir el líquido amniótico incluyendo su formación, funciones y constituyentes normales.
- ♦ Describir las alteraciones bioquímicas maternas usuales normales y patológicas que ocurren durante el embarazo.
- ♦ Describir las alteraciones bioquímicas fetales que ocurren durante el desarrollo prenatal.
- ♦ Describir las condiciones patológicas asociadas con el embarazo o el período perinatal y listar los niveles de laboratorio esperados de los analitos de significación.

Términos claves

anencefalia Desarrollo defectuoso del cerebro con ausencia de los hemisferios cerebrales y cerebelosos.

blastocisto Fase temprana del desarrollo embriológico que se caracteriza por la presencia de una cavidad ocupada por líquido en el interior de la masa celular y recubierta de trofoblasto.

cuerpos lamelares La forma física de los tensoactivos pulmonares que sobresalen desde los neumocitos tipo II.

embarazo ectópico Embarazo que ocurre fuera de la cavidad uterina, más frecuentemente en las trompas de Falopio.

espina bífida Una anomalía de desarrollo caracterizada por un cierre defectuoso de la médula espinal.

hemopoyético Relativo al proceso de formación y desarrollo de los



diversos tipos de células sanguíneas.

meningomielocoele Protuberancia de las membranas meníngeas y de la médula espinal como consecuencia de un defecto de la columna vertebral.

oligohidramnios Presencia de menor líquido amniótico que el usual para una determinada edad gestacional.

polihidramnios La acumulación de una cantidad excesiva de líquido amniótico.

queratinización Proceso en el desarrollo y diferenciación de la piel mediante el cual se produce una sustancia proteínacea, la queratina.

trasudación Pasaje de una sustancia a través de una membrana como resultado de una diferencia de presión hidrostática.

trofoblasto Capa celular que recubre el blastocisto y erosiona el revestimiento interno del útero durante el proceso de implantación. Las células trofoblásticas no forman parte del embrión propiamente dicho pero contribuyen a la formación de la placenta.

Alteraciones Anatómicas y Fisiológicas Entre la Madre y el Feto

Fertilización e implantación del óvulo

El capítulo 45 revisa los cambios bioquímicos requeridos para el desarrollo exitoso y liberación de un óvulo. Después de la ovulación, el óvulo se expulsa hacia la cavidad peritoneal donde se mueve hacia las dos trompas de Falopio por la acción de las células epiteliales ciliadas o hacia los tentáculos fimbriados. La fertilización normalmente ocurre después de que el óvulo entra a los tubos o inmediatamente de ellos. Se requieren aproximadamente 3 días para transportar el óvulo fertilizado a través del tubo hacia la cavidad del útero. Se requieren entre 2 y 5 días adicionales para la implantación del óvulo en el endometrio del útero. Así, la implantación del óvulo creciente, el *blastocisto*, típicamente ocurre luego de 5 a 8 días de la fertilización. La implantación resulta de la digestión proteolítica del endometrio por los trofoblastos recubriendo la superficie del blastocisto (Fig. 40-1). Una vez que la implantación se ha completado, los trofoblastos y las células endometriales proliferan rápidamente de manera coordinada, formando la placenta y sus membranas. La placenta sirve para separar el cuerpo extraño, el *feto*, del huésped maternal, y proveer una interfase entre los sistemas circulatorios fetal y maternal. A través de esta interfase son entregados al feto los nutrientes de la sangre materna, y los desechos fetales son entregados a la madre para una final eliminación.

Como las demandas de nutrimento y oxígeno aumentan por el rápido crecimiento embrionario, el trofoblasto incrementa su área superficial formando vellosidades. Esta área es enorme, y se establece desde allí la circulación placentaria fetal. La membrana más interna, el amnios, rodea inmediatamente al embrión y se llena con fluido. Este fluido, denominado como *líquido amnii*, o *líquido amniótico*, baña al feto, de este modo previene la desecación y amortigua al feto de agresiones mecánicas. La sangre en la placenta deriva de la circulación fetal.



Desarrollo y nutrición del feto

El feto crece y se desarrolla a expensas de la nutrición proporcionada por la sangre materna. Para mantener un suministro adecuado y continuo de los sustratos necesarios para el desarrollo fetal, se requieren ajustes metabólicos maternos continuos. A diferencia del *lactante*, cuya dieta consiste en una mezcla compleja de carbohidratos, grasas y proteínas, la del *feto* se compone principalmente de glucosa, junto con una cantidad suficiente de aminoácidos como para cubrir el requerimiento de nitrógeno para la síntesis proteica. Esta dieta también incluye una pequeña cantidad de ácidos grasos, cetonas, vitaminas y minerales, esenciales para mantener el crecimiento y las funciones normales. Aunque la glucosa provee la mayoría de la energía necesaria para la formación de tejidos, los aminoácidos pueden servir como una fuente alternativa de combustible oxidable. Durante períodos de ayuno de la madre las cetonas también pueden servir como fuente alternativa de energía fetal y como precursores para proteínas y lípidos.

La cantidad de glucosa disponible para el feto depende de su concentración en la sangre materna, la cual a su vez es regulada por la acción de diversas hormonas, incluyendo la insulina y la hormona placentaria, somatotropina coriónica humana (también denominada lactógeno placentario humano, LPH). La glucosa pasa rápidamente desde la circulación materna a la fetal por medio de “difusión facilitada”, cruzando la placenta a una velocidad mayor a la esperada en terrenos fisiológicos solos. Una elevación de la concentración sanguínea de glucosa en la sangre materna es seguida rápidamente por un incremento similar en la concentración de glucosa en la sangre fetal. Sin embargo, estos valores no son iguales, dado que siempre existe un gradiente de concentración desde la madre al feto. Además, la placenta consume una fracción significativa de glucosa con el objetivo de cubrir sus propios requerimientos energéticos.

Dado que los niveles de glucosa del feto reflejan los de la madre, hay una pequeña necesidad del feto de regular su propia concentración de glucosa sanguínea. Los mecanismos para llevar a cabo dicha regulación se desarrollan durante el período fetal, pero, excepto en los lactantes de madres diabéticas hiperglicémicas, estos mecanismos permanecen latentes hasta el nacimiento, momento en que la provisión de glucosa a través de la placenta se interrumpe bruscamente. No obstante, existen dos importantes procesos que se encuentran activos desde una etapa temprana. El primero de estos procesos consiste en el almacenamiento de glucosa como glucógeno o grasa para cubrir las necesidades metabólicas del recién nacido hasta que comience su alimentación. El segundo mecanismo es el control de la velocidad con la que es utilizada la glucosa al nivel de los tejidos en desarrollo, y este mecanismo es principalmente atribuible a la acción de la insulina segregada por el páncreas fetal comenzando a la edad gestacional de 8 a 9 semanas.

Papel de la placenta en el intercambio gaseoso

Para poder cubrir sus necesidades metabólicas, el feto depende por completo de una provisión continua de oxígeno a través de la placenta. Los intercambios transplacentarios, incluyendo el intercambio de gases, se lleva a cabo en función de la perfusión y la permeabilidad. La perfusión placentaria es una combinación de los flujos sanguíneos uterino y umbilical, mientras que la permeabilidad es una característica de la membrana placentaria. En condiciones normales, con una madre adecuadamente oxigenada, el transporte de oxígeno a

través de la placenta es regulado principalmente por el flujo sanguíneo. Para alcanzar las demandas crecientes del feto en crecimiento, el flujo sanguíneo uterino y la permeabilidad de la membrana placentaria aumentan durante la gestación. En los casos de hipoxia materna, el transporte de oxígeno a través de la placenta se encuentra limitado principalmente por la permeabilidad de la membrana placentaria.

El dióxido de carbono difunde rápidamente a través de la placenta en ambas direcciones. Esto permite al feto mantener una PCO_2 normal y a la madre eliminar dióxido de carbono. La placenta tiene una permeabilidad limitada a los iones bicarbonato, por lo tanto le permite al feto disponer de dióxido de carbono mientras lo protege de una acidosis metabólica materna.

Formación de líquido amniótico

El volumen de sangre en el saco amniótico, el cual rodea al embrión en desarrollo, aumenta durante el embarazo hasta que alcanza un volumen máximo aproximadamente a las 36 semanas de gestación. (Tabla 40-1). Muchas anomalías maternas y fetales pueden producir estados de oligohidramnios o polihidramnios. El volumen de líquido amniótico en cualquier momento es el resultado de un equilibrio dinámico entre su producción y su eliminación. El líquido amniótico se origina en fuentes múltiples, y la contribución relativa de cada una de estas fuentes varía según sea el estadio de desarrollo fetal. Las fuentes múltiples incluyen la placenta, los riñones fetales, la piel, las membranas, los pulmones, y los intestinos. En la primera mitad del embarazo, el líquido amniótico se forma como un trasudado desde la superficie de la piel del feto. La composición del líquido amniótico es similar a la del líquido extracelular, y debe ser considerada como una extensión del espacio líquido extracelular fetal. En una fase posterior del embarazo, los riñones y pulmones asumen un papel principal en la formación de líquido amniótico, y su volumen depende ahora del balance entre la eliminación urinaria fetal y el volumen de líquido amniótico deglutido.^{ref(1671)}

El líquido que fluye fuera de la tráquea y la faringe hacia el interior del esófago puede ingresar a la cavidad amniótica. Esto provee una base para explicar la aparición del agente tensoactivo pulmonar (“surfactante”) en el líquido amniótico. Los movimientos respiratorios fetales mezclan rápidamente el líquido con el agente tensoactivo, ya que estos movimientos producen un intercambio de volumen en forma de marea (hacia adentro y hacia fuera) de aproximadamente 600 a 800 mL/día^{ref(1672)} a través de los pulmones fetales, durante todo el tercer trimestre.

La remoción del líquido amniótico es llevada a cabo parcialmente por los movimientos fetales de deglución. Se estima que esta vía transporta entre 200 y 450 mL de líquido amniótico por día desde la cavidad amniótica; este mecanismo sería responsable de cerca de la mitad de la orina producida diariamente por el feto. Dado que la cavidad amniótica gana un volumen de líquido no mayor de 10 mL/día durante el tercer trimestre (la concentración total de solutos siempre permanece en el intervalo normal), es lógico suponer que una cantidad importante de orina debe ser canalizada por reabsorción a través de otras rutas.^{ref(1673)}

Bioquímicos del Líquido Amniótico



Están disponibles excelentes monografías acerca de las características del líquido amniótico, que enumeran los constituyentes bioquímicos de dicho líquido. [refs\(1674\)](#)

Agua, electrolitos, y productos nitrogenados

Debido al cambio en la fuente de líquido amniótico que ocurre hacia la mitad del embarazo, los constituyentes de dicho líquido también cambian durante la gestación. Antes de la queratinización de la piel, el líquido amniótico podría ser un trasudado de la superficie del feto. Después de la queratinización y con el desarrollo progresivo del sistema renal, la orina fetal contribuye mayormente al compartimento del líquido amniótico. La composición bioquímica del líquido amniótico por lo tanto refleja las rutas de formación de dicho líquido y está relacionado con la etapa de desarrollo del feto.

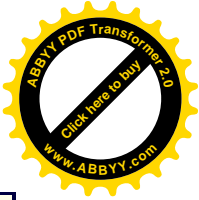
El líquido amniótico es isotónico durante una fase temprana de la gestación pero cerca del término se convierte en moderadamente hipotónico (concentración total de solutos, 255 mOsm/kg de agua) comparado con el plasma fetal y materno. Este cambio en la concentración del líquido amniótico refleja la maduración de la función renal del feto. La presión osmótica y oncótica en los tejidos materno y fetal produce una transferencia de agua desde la madre al feto, hacia el líquido amniótico y nuevamente hacia la madre. Se ha calculado que la transferencia neta de agua de la madre al feto alcanza 20 a 25 mL/día al final del embarazo. [ref\(1675\)](#)

Las concentraciones en el líquido amniótico de productos nitrogenados del metabolismo, creatinina, urea, y ácido úrico aumentan hacia el final del embarazo (ver más adelante), pero son menores que las concentraciones encontradas en la orina materna. La diferente composición entre el líquido amniótico y la orina materna es fácilmente mensurable y puede ser usada para determinar si una muestra obtenida de un escape vaginal o una amniocentesis equivocada es líquido amniótico.

Proteínas

Se han identificado diversas fuentes para las proteínas del líquido amniótico. Bajo condiciones normales, las proteínas del líquido amniótico de origen fetal provienen de la piel, los tractos urinario y gastrointestinal (orina y meconio respectivamente), y del tracto respiratorio. Las proteínas del tracto respiratorio son parte de los productos proteolípidos segregados por las células epiteliales tipo II de los pulmones fetales. Estos productos funcionan como componentes del sistema tensoactivo pulmonar. [ref\(1676\)](#) Se han descrito por lo menos cuatro especies de proteínas surfactantes (SP): SP-A, B, C, y D. Estas difieren en el peso molecular, en la carga y posiblemente en la función. Las proteínas de origen materno pueden entrar al líquido amniótico por trasudación a través del amnios. Bajo condiciones anormales, pueden producirse rutas inusuales de intercambio de proteínas, como ser el tubo nervioso central desarrollando defectos, lo cual aumenta los niveles de α -fetoproteína en el líquido amniótico (ver más adelante).

Se han identificado más de 50 enzimas en el líquido amniótico, [refs\(1677\)](#) pero el origen de muchas de estas enzimas y su función en el líquido amniótico no están definidos claramente. Las enzimas pertenecen a dos categorías: aquellas cuya actividad se expresa en forma máxima en una fase temprana del embarazo (12 a 20 semanas) y aquellas que muestran una actividad en una etapa posterior de la gestación (35 a 40 semanas). Algunas enzimas de origen fetal,



como la fosfatasa alcalina y la γ - glutamil-transferasa, ayudan a diagnosticar errores particulares congénitos del metabolismo.

Hormonas

Ejemplos de hormonas que han sido identificadas en el líquido amniótico se enumeran en el recuadro que está más adelante. Esta lista incluye hormonas derivadas de esteroides (como las catecolaminas), péptidos y aminoácidos. Aunque muchas de estas hormonas son productos de la excreción urinaria o biliar del feto, algunas poseen utilidad clínica y serán discutidas más adelante. Existen disponibles listas más amplias. [refs\(1678\)](#)

Ejemplos de hormonas identificadas en el líquido amniótico
Proteínas y polipéptidos Hormona adrenocorticotrópica Angiotensinas Endorfina Hormona folículo-estimulante Hormona del crecimiento Gonadotropina coriónica humana Lactógeno placentario humano Insulina Hormona luteinizante Ocitocina Prolactina Relaxina Renina Somatomedina Somatostatina Tiotropina Tiroxina
Esteroides Estradiol Estriol Estrona
Prostaglandinas E ₂ F _{2α}

Alteraciones Bioquímicos Maternas Durante el Embarazo

Gonadotropina coriónica humana

La orina y el suero de la mujer embarazada contienen elevadas concentraciones de

gonadotropina coriónica humana (GCH), producida por los trofoblastos, y proporciona la base de las pruebas diagnósticas de embarazo. Existen métodos analíticos específicos y sensibles para la subunidad β de la cadena de GCH que permite la detección temprana del embarazo tan pronto como a los 8 días de ovulación (1 día después de la implantación). Las concentraciones de GCH se elevan en una fase temprana del embarazo y alcanzan un nivel máximo alrededor de la octava a la décima semana de gestación (Fig. 40-2).

La gonadotropina coriónica humana es uno de los miembros de una familia de hormonas glucoproteicas íntimamente relacionadas, que regulan las funciones reproductoras y metabólicas. Esta familia incluye la hormona folículo estimulante (FSH), la luteinizante (LH), y la hormona estimulante de la tiroides (TSH). Todas estas hormonas están compuestas por dos unidades polipeptídicas designadas como cadenas α y β , y todas contienen carbohidratos, como lo indica el término *glicoproteína*. Las cadenas alfa de la GCH, LH, FSH y TSH son casi idénticas en cuanto a su secuencia de aminoácidos, hallazgo que explica la similitud inmunológica de estas hormonas proteicas. [ref\(1679\)](#)

Las cadenas β de estas hormonas glucoproteicas les confieren su especificidad biológica, dado que ellas difieren en lo que respecta a sus secuencias de aminoácidos, excepto la GCH y la LH. Estas últimas dos hormonas son virtualmente idénticas y sólo difieren en su contenido de carbohidratos ya que la GCH contiene cerca de un 30% de carbohidratos en relación con su peso y la LH contiene aproximadamente la mitad de esa cantidad. Esta similitud permite que se use GCH en lugar de LH para provocar una ovulación inducida. Esta diferencia en el contenido de carbohidratos influye perceptiblemente sobre el modelo metabólico de estas hormonas, confiriendo a la GCH una vida media de 6 horas, mientras que la vida media de la LH plasmática es de 12 a 45 minutos. Estas diferencias en la depuración metabólica se correlacionan con nuestros conocimientos acerca de las funciones de estas hormonas, dado que la LH regula el complicado proceso de la ovulación y la posterior formación del cuerpo amarillo y la GCH proporciona una estimulación continua del cuerpo amarillo (cuerpo lúteo) con el objeto de garantizar una producción ininterrumpida de progesterona hasta que la placenta pueda aportar la cantidad suficiente para mantener la gestación. (Por más detalles ver capítulo 40).

Estrógenos

Hace cerca de medio siglo se observó que existía un sustancial incremento en la excreción de estrógenos con el embarazo. El estrógeno predominante fue reconocido como estriol, y no los estrógenos ováricos usuales, estradiol o estrona (Fig. 40-3). Solamente muchos años más tarde fue posible dilucidar las relaciones particulares que determinan el ciclo de la formación de estriol. La síntesis de estriol durante el embarazo tiene lugar sólo en los primates más elevados, para que se produzca la formación de este “estrógeno de la gestación” es necesaria la interacción obligatoria entre el feto y la placenta” proporcionando la base de una de las pocas pruebas bioquímicas disponibles para la evaluación del bienestar fetal.

La formación de estrógenos tiene lugar mediante una secuencia obligada de reacciones, que determinan la conversión del colesterol en progestinas, luego en andrógenos y por último en estrógenos (ver Capítulo 45). En el ovario, esta secuencia se produce solamente en el interior del órgano. En el embarazo, para que pueda tener lugar esta serie de reacciones, se requiere una interacción complementaria entre la placenta, la corteza adrenal fetal y el hígado



fetal, la cual conduce a la formación de estriol. Esta relación única se designa como *unidad fetoplacentaria*^{ref(1680)} (Fig. 40-4).

La glándula adrenal fetal sintetiza la dehidroepiandrosterona (DHEA), la cual es convertida por el hígado fetal a 16 α -hidroxi-DHEA. Este es convertido en estriol por enzimas aromatizantes de la placenta. Además, la placenta posee una sulfatasa muy activa. El proceso de sulfatación-desulfatación del estriol parece encontrarse integralmente involucrado en la transferencia de esteroides desde la placenta, puesto que en condiciones en las que la sulfatasa placentaria está ausente, es característico encontrar niveles reducidos de estriol en la madre.^{ref(1681)}

El estriol representa más del 90% de los estrógenos maternos conocidos del embarazo. Es metabolizado a través de formas conjugadas por el hígado materno, como sulfato y como glucorónido, las cuales son las principales formas de excreción. La concentración en el suero materno aumenta a medida que avanza la gestación y alcanzan un valor de casi 40 ng/mL al término del embarazo. La Fig. 40-5 ilustra el incremento normal del estriol plasmático y el patrón observado en una paciente diabética, con muerte fetal y con retardo del desarrollo. El estriol también se encuentra en el líquido amniótico.^{ref(1682)}

El papel funcional desempeñado por el estriol en el embarazo ha generado un considerable grado de especulación. En muchos sistemas de pruebas biológicas, el estriol es un estrógeno débil y exhibe sólo una centésima parte de la potencia del estradiol y una décima parte de la potencia de la estrona por unidad de peso. Sin embargo, el estriol muestra la misma potencia que el estradiol en cuanto a su capacidad de promover el flujo sanguíneo uteroplacentario. Por esta razón, su función en el embarazo consiste en garantizar un flujo sanguíneo óptimo en el útero grávido.

Más recientemente, el estrógeno estetrol (Fig. 40-3) es considerado como un índice más completo que el estriol del estado del feto en el útero.^{ref(1683)} El estetrol (E_4) a diferencia del estriol (E_3), no sufre un metabolismo ulterior en el hígado materno. Además, los niveles del E_4 reflejan específicamente la actividad hepática fetal, mientras que los de E_3 dependen de las glándulas adrenales fetales. Una vez que el E_4 es formado por el hígado del feto, se dirige hacia la circulación materna y es excretado en la orina como E_4 -glucorónido. La supuesta ventaja de la medida del E_4 se basa en la creencia que postula que este estrógeno refleja más directamente la actividad fetal. Las evaluaciones clínicas del estado fetal no han demostrado sin embargo una clara ventaja del estetrol con respecto al estriol.^{ref(1684)}

Tiroides

La concentración de globulina fijadora de tiroxina (GFT) es doblada al final del primer trimestre, y se mantiene elevada por el resto del embarazo. Debido al aumentado número de sitios de unión disponibles para la hormona tiroides, la cantidad total de tiroxina (T_4) y triyodotironina (T_3) se encuentra aumentado en la sangre; este incremento es mayor para la T_4 que para la T_3 , la cual está generalmente aumentada solo en el último trimestre. Las mujeres embarazadas generalmente son eutiroides, aunque hipertiroidémicas. Aunque la fisiología de la tiroides materna está claramente alterada durante el embarazo, los mecanismos por lo que esto ocurre no son claros. En respuesta al aumento de producción de estrógenos durante el embarazo, el hígado materno sintetiza cantidades elevadas de GFT.^{ref(1685)} La concentración de GFT se dobla al final del primer trimestre y permanece elevada por el resto

del embarazo. Este aumento de GFT en el suero condiciona la actividad de la tiroides aumentando los niveles de hormona tiroidea en la circulación. Sin embargo, permanece en discusión el grado al que los niveles de estas hormonas cambian durante el embarazo, en parte debido a los defectos analítico técnico y metodológicos en los análisis de la hormona tiroidea.

La glándula tiroides materna aumenta de tamaño durante la gestación debido a una hiperplasia glandular y a una vascularidad aumentada.^{refs(1686)} Aunque no se ha definido un mecanismo aparente, hay evidencia considerable que indica una posible asociación entre la estimulación de la tiroides y los niveles aumentados de GCH.^{refs(1687)} La gonadotropina coriónica humana y la TSH poseen subunidades alfa casi idénticas y cadenas beta similares; así, la GCH podría tener una actividad estimulante de la tiroides similar a la TSH. Se ha mostrado que los niveles de GCH aumentan durante la primera mitad del embarazo, mientras que los niveles de TSH aumentan durante la segunda mitad.^{ref(1688)} Numerosos estudios han mostrado que los niveles aumentados de GCH asociados con enfermedad trofoblástica están acompañados por hipertiroidismo y tirotoxicosis,^{ref(1689)} y las células de la tiroides que crecen en este ambiente han mostrado ser estimuladas por la GCH.^{ref(1690)} La hormona tiroides y la TSH no atraviesan la placenta. En el capítulo 44 puede hallarse una amplia discusión de todos los aspectos relativos a las funciones tiroides y paratiroidea en el embarazo. Lowe y Cunningham dan un resumen de los mecanismos patofisiológicos de enfermedad de la tiroides durante el embarazo.^{ref(1691)}

Lípidos séricos

En el embarazo normal se desarrolla una hiperlipidemia y puede ser el resultado de alteraciones en los niveles hormonales. Las mujeres embarazadas tienen mucho aumento en las concentraciones de lípidos séricos totales que aumenta progresivamente durante el embarazo, con niveles más alto en el segundo y tercer trimestre.^{ref(1692)} Estos niveles se estabilizan a los niveles de pre-embarazo después de dar a luz, dando así apoyo adicional al papel de las hormonas relacionadas al embarazo en la regulación de los niveles de lípidos séricos. Todos los componentes lipídicos del suero están aumentados, pero la fracción de triglicéridos muestra el mayor incremento proporcional. La relación entre proteínas de alta densidad y baja densidad (HDL/LDL) disminuye durante la progresión del embarazo, los niveles de HDL permanecen disminuidos un año después del embarazo.^{ref(1693)} Los anticonceptivos orales pueden tener algunos efectos sobre los niveles de HDL, pero se necesitan estudios más completos.

Proteínas séricas y función hepática

La concentración total de proteínas séricas disminuye en aproximadamente 1 g/L en el embarazo. La mayor parte de este descenso se produce durante el primer trimestre. Esta disminución afecta principalmente a la albúmina. Las globulinas α_1 , α_2 , y β se elevan lenta y progresivamente. La gamma globulina tal vez descienda ligeramente. El componente IgG, el cual representa la principal inmunoglobulina transferida al feto, disminuye progresivamente. Durante la gestación, el fibrinógeno aumenta en forma progresiva, con valores al término equivalentes de un 30% a 50% por encima de los niveles en mujeres no grávidas. Los factores de coagulación VII, VIII, IX y X también están incrementados, mientras que la protrombina y los factores V y XII se hallan reducidos. Las alteraciones a nivel de los factores de

coagulación y del plasminógeno probablemente sean una consecuencia de la acción estrogénica sobre el hígado.

Bajo la influencia del estrógeno aumentado, el hígado materno aumenta la síntesis de transcortina (globulina fijadora de corticoides). Esto resulta en aumentados niveles de cortisol total durante el embarazo, casi el doble durante la fase tardía del embarazo. Sin embargo, los niveles de cortisol activo libre son normales.

Muchas pruebas funcionales del hígado se modifican en el embarazo. Por ejemplo, la actividad inespecífica de la fosfatasa alcalina sérica casi se duplica durante la gestación normal lo que sería considerado anormal en la mujer no embarazada. Una gran parte de este aumento es atribuible a la elevación de isoenzimas de esta enzima, que se originan en la placenta. [ref\(1694\)](#)

Glucosuria

La glucosuria es común en mujeres embarazadas sanas. La excreción de glucosa aumenta muy temprano en el embarazo, alcanzando un pico entre las semanas 8 y 11 de gestación. El grado de glucosuria varía de ahí en adelante. El aspecto cardinal de la glucosuria del embarazo es la gran variabilidad de día a día y durante el curso de un día. La causa de la glucosuria en el embarazo parece ser la disminución de la eficiencia de reabsorción de glucosa por los riñones. [ref\(1695\)](#)

Por estos comentarios se puede ver que el embarazo es potencialmente diabetogénico. La diabetes mellitus puede agravarse con el embarazo, en algunas mujeres solamente durante el embarazo puede aparecer diabetes clínica. El transporte renal de glucosa durante el embarazo ofrece un particular interés debido a la aparición frecuente de glucosuria y a la necesidad de diferenciar esta “glucosuria renal” de la correspondiente a una diabetes mellitus agravada por el embarazo. Debido a las variables asociadas con una fisiología renal alterada en el embarazo, las mujeres diabéticas embarazadas deberían monitorearse por los niveles de glucosa en sangre porque las pruebas de orina pueden dar valores engañosos. Es de rutina el “tamizaje” para diabetes gestacional por una prueba de tolerancia a la glucosa. Es importante mantener la glucosa sanguínea dentro de los intervalos normales para prevenir la morbilidad perinatal asociada con la hiperglucemia gestacional.

Alteraciones Bioquímicas Fetales Durante el Desarrollo Prenatal

Función hepática

El hígado contiene un gran número de células hematopoyéticas que desaparecen después del nacimiento. En una fase muy temprana de la vida fetal, el hígado es el principal órgano formador de sangre, pero alrededor de las semanas 22 a 24 de gestación la médula asume la mayor responsabilidad en la formación de sangre. Debido a la cantidad sumamente variable de los diferentes tipos celulares en el hígado del recién nacido, los patrones de la actividad enzimática son considerablemente diferentes a los del adulto.

El saco vitelino y después el hígado fetal producen α -fetoproteína (AFP), la cual es liberada a la circulación fetal. Esta proteína pasa al líquido amniótico desde la sangre a través de la orina. Normalmente es depurada del líquido amniótico mediante la deglución fetal. La α -fetoproteína en la sangre materna aparece durante todo el embarazo (Fig. 40-6), donde puede ser fácilmente medida para el tamizaje de defectos del tubo neural.



La necesidad fetal de una mayor cantidad de aminoácidos para la síntesis proteica se realiza mediante el transporte placentario. Este transporte representa un proceso activo contra un gradiente de concentración que depende del flujo sanguíneo placentario y, en menor grado, de la concentración de aminoácidos en el plasma materno.

Debido a que la maduración fetal no es totalmente completa al producirse el nacimiento, durante la primera semana de vida suele aparecer en todos los recién nacidos un cierto grado de ictericia. Este fenómeno se designa como *ictericia fisiológica*. La pigmentación amarillenta, o icterica, es provocada por la bilirrubina que proviene de la destrucción normal de eritrocitos, y el hígado fetal inmaduro aún no ha desarrollado su capacidad completa para depurar la bilirrubina de la sangre. (Para detalles ver pags. 803 y 804).

Función renal

La función principal del riñón de los mamíferos consiste en mantener el equilibrio hidroelectrolítico. Este proceso se lleva a cabo mediante la excreción o retención selectiva de agua y solutos de acuerdo con las condiciones existentes. En el feto, el equilibrio hidroelectrolítico es mantenido en gran parte por la placenta. Por esta razón, los fetos sin riñones funcionales a menudo no exhiben anomalías del equilibrio hidrosalino. Por lo tanto, el desarrollo de la función renal se relaciona principalmente con la vida extrauterina.

Los compuestos nitrogenados orgánicos como la urea, el ácido úrico y la creatinina (Fig. 40-7) aumentan gradualmente su concentración en el líquido amniótico a medida que el sistema renal del feto madura. En una fase temprana del embarazo, estos compuestos muestran concentraciones similares en el líquido amniótico y en la sangre materna y fetal; a medida que el embarazo avanza, estas sustancias aumentan en forma gradual hasta alcanzar niveles significativamente mayores en el líquido amniótico que en la sangre materna y fetal. Una elevación marcada de la creatinina alrededor de las 37 semanas de gestación determina una elevación de las concentraciones de urea y creatinina en el líquido amniótico equivalente a dos o tres veces la concentración presente en el suero normal.^{[ref\(1696\)](#)}

Desarrollo pulmonar

En el momento de nacer se produce una brusca transición fisiológica que obliga al recién nacido a asumir funciones vitales que previamente eran llevadas a cabo por la circulación materna. El pulmón pasa de ser un órgano ocupado por líquido a un sistema de intercambio de gases en el curso de unos pocos minutos. Esta transición funcional sólo es posible si durante el desarrollo se ha alcanzado un grado suficiente de maduración del pulmón fetal. El proceso de maduración fetal pulmonar parece consistir de dos componentes distintos: (1) el desarrollo morfológico de los pulmones fetales y (2) la síntesis, almacenamiento y liberación de un tensoactivo pulmonar. En este último proceso, el mecanismo de control para la síntesis y almacenamiento del tensoactivo pulmonar parece ser distinto del responsable de su liberación.^{[ref\(1697\)](#)} Así, los pulmones funcionales deben tener desarrollados alvéolos con un área superficial adecuada con una vascularización para el intercambio de gases, y debe tener disponible suficiente tensoactividad para mantener los movimientos ventilatorios necesarios para la función pulmonar. El desarrollo de estos procesos está altamente organizado y coordinado con la evolución temporal de los eventos anatómicos y bioquímicos.

El agente tensoactivo facilita la función pulmonar al menos de dos maneras: mantiene la estabilidad alveolar mediante la prevención del colapso del árbol respiratorio terminal y reduce la presión necesaria para distender el pulmón en la fase inicial de la inspiración. Los niños que desarrollan el síndrome de dificultad respiratoria exhiben una mayor tensión superficial a nivel de la interfase aire alveolar-líquido como resultado de una deficiencia del sistema tensoactivo pulmonar. El agente tensoactivo humano está compuesto principalmente por fosfolípidos y contiene fracciones de ácidos grasos altamente saturadas. [ref\(1698\)](#) En las Figs. 40-8 y 40-9 se ilustran los constituyentes principales y sus concentraciones relativas. Aparte de las lecitinas saturadas en forma inusualmente elevada, otros importantes componentes del sistema tensoactivo incluyen fosfatidilglicerol y las apoproteínas tensoactivas (SP). Estas proteínas pueden tener un papel clave capacitando la función del tensoactivo mejorando la rapidez con que el tensoactivo puede diseminarse para formar una monocapa a lo largo de la interfase aire-agua de los alvéolos. Además, no están completamente descritas las diferencias funcionales entre las SP individuales, evidencias recientes indican que la proteína B tensoactiva (SP-B) puede ser la más importante del sistema tensoactivo pulmonar. [ref\(1699\)](#) Esto se cree que es el resultado de la única interacción de esta proteína con fracciones de fosfolípidos en el tensoactivo. Esta interacción agrega estabilidad a la monocapa de tensoactivo, aumentando así la habilidad de dicha capa para resistir la tensión superficial y prevenir el colapso alveolar. Se han publicado detalladamente la función y la composición bioquímica del sistema tensoactivo pulmonar. [refs\(1700\)](#)

El tensoactivo se forma en las células epiteliales alveolares voluminosas conocidas como neumocitos tipo II, las cuales representan alrededor del 10% de las células del pulmón. Aunque los caminos biosintéticos para los fosfolípidos individuales están bien descritos, mucho queda por aprender acerca de los factores responsables de su regulación. La síntesis y el almacenamiento comienzan alrededor de las semanas 24 y 28 de edad gestacional. [ref\(1701\)](#) Al comenzar las 32 semanas, este material se libera desde los neumocitos tipo II en la forma de estructuras únicas especializadas llamadas *cuerpos lamelares* (LB). Este término describe la estructura arrollada concéntricamente de estas partículas vistas con un microscopio electrónico. Una vez en el espacio aéreo alveolar, las LB se desenrollan para formar la mielina tubular. La mielina tubular luego permanece en el espacio alveolar donde se esparce en una monocapa de tensoactivo a la interfase aire-líquido con el alvéolo. Durante la respiración normal más del 50% del material tensoactivo activo es reabsorbido y subsecuentemente vuelto a liberar por los neumocitos tipo II. [ref\(1702\)](#)

Hemoglobina

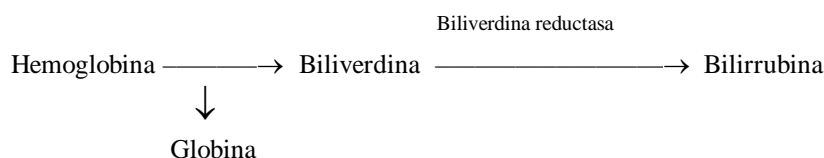
El embrión posee una hemoglobina característica del estadio embrionario del desarrollo, que es remplazada durante la vida fetal por la "hemoglobina fetal" (HbF) y finalmente por la hemoglobina adulta (HbA). [ref\(1703\)](#) En la Fig. 40-10 se ilustran los patrones hemoglobínicos presentes durante el desarrollo. Se ha observado que la hemoglobina fetal representa un 34% de la hemoglobina total en un embrión inmediatamente por debajo de la 7 semana. [ref\(1704\)](#) A aproximadamente 10 semanas de gestación, la hemoglobina embrionaria disminuye al 10% de la hemoglobina total presente. Antes de la finalización del tercer trimestre (menos de 12 semanas), la HbF aumenta hasta llegar a representar alrededor de un 90% del total, con el porcentaje constituido por HbA. A partir de este momento, la HbF permanece constante hasta aproximadamente las 36 semanas de gestación, en que se produce

una disminución. Este descenso se debe principalmente a un incremento de la síntesis de la HbA más que a una reducción de la HbF. En el momento de nacer se observa un aumento neto de la HbA en los reticulocitos y eritrocitos. Las modificaciones evolutivas en los sitios de hematopoyesis, de la morfología eritrocítica y de los diferentes tipos de hemoglobina pueden apreciarse en la Fig. 40-11.

Las diferencias fisiológicas en las hemoglobinas son resumidas por Kleihauer^{ref(1705)} e incluyen diferencias en afinidad por el oxígeno, resistencia a medios ácidos, básicos, desnaturalización por calor; y propiedades electroforéticas y cromatográficas. La diferencia en cuanto a la afinidad por el oxígeno de la HbF puede apreciarse en la curva de saturación de la oxihemoglobina fetal, la cual está desviada hacia la izquierda con respecto a las curvas maternas en condiciones normales. En realidad, cuando el oxígeno difunde desde la sangre materna, con una PCO₂ de aproximadamente 34 mm Hg, hacia la sangre fetal, con una PCO₂ de alrededor de 30 mm Hg, es transportado contra un gradiente de concentración.

Bilirrubina

La destrucción de los eritrocitos precede a la formación de bilirrubina. La biliverdina representa el producto principal e inicial de degradación de la hemoglobina y es un importante pigmento intermedio en la formación de bilirrubina, (por más detalles ver Capítulo 27). Este proceso puede representarse en forma simplificada:



Las concentraciones plasmáticas de bilirrubina son generalmente bajas en la circulación fetal, excepto en circunstancias inusuales, como en la *eritroblastosis fetal* severa (ver pag.804). Incluso en circunstancias en las que la rápida degradación de los eritrocitos conduce a una producción acelerada de bilirrubina, como ocurre en la incompatibilidad sanguínea materno-fetal severa, la concentración de bilirrubina en la sangre del cordón umbilical raramente excede los 50 mg/L. Esto se debe a la transferencia rápida y eficiente del pigmento a través de la placenta y a la regulación igualmente eficaz de la bilirrubina fetal por el sistema materno.

Después del nacimiento, el recién nacido pierde el mecanismo placentario de eliminación de bilirrubina. Como resultado de esta carencia, se observa una ligera acumulación de bilirrubina no conjugada en el plasma. La ictericia resultante de esta modificación de las circunstancias fisiológicas está relacionada con la capacidad limitada del hígado inmaduro para incorporar, conjuguar y excretar la bilirrubina. El grado de ictericia neonatal que ocurre al nacer depende de la madurez y salud del hígado en el momento del nacimiento. En el capítulo 35 se puede encontrar una discusión sobre el transporte y el metabolismo hepático de la bilirrubina.

Condiciones Patológicas Asociadas con el Embarazo y el Período Perinatal



Trastornos placentarios

El adecuado intercambio a través de la placenta entre las circulaciones materna y fetal es esencial para el crecimiento y el metabolismo normal del feto. Una cantidad inferior a la óptima de sustancias nutritivas, produce la formación de fetos pequeños en relación con la edad gestacional, mientras que, en los casos que la cantidad de dichas sustancias es excesiva, como ocurre en los casos de diabetes materna, es común el desarrollo de niños voluminosos en relación con la edad gestacional.

Existen pocas condiciones patológicas que afectan la placenta donde el monitoreo bioquímico es útil. Un ejemplo es la mola hidatiforme. El tejido molar es una anomalía del desarrollo de la placenta con una capacidad potencial de crecimiento maligno. Este trastorno es la lesión más frecuente que antecede al coriocarcinoma. Dado que la mola está compuesta por tejido trofoblástico existe una producción de GCH, con una prueba de embarazo positiva. Si los valores séricos o urinarios de GCH exceden los niveles típicos de los diferentes períodos del embarazo, es posible establecer un diagnóstico presuntivo de mola, aunque, debido a la variabilidad de los valores de GCH en el embarazo normal, no es posible establecer un límite determinado entre valores normales y anormales. Como se dispone de métodos altamente sensibles y específicos para la evaluación de la GCH sérica, esta hormona es de gran utilidad en el monitoreo de la respuesta de la mola hidatiforme a la terapéutica empleada.

Inmadurez pulmonar fetal

El sistema pulmonar es el último de los sistemas orgánicos en madurar suficientemente como para sustentar la vida extrauterina. La inmadurez pulmonar fetal, o el síndrome de dificultad respiratoria (RSD), ocurre con mayor frecuencia cuando existe una deficiencia de agente tensoactivo pulmonar.[ref\(1706\)](#) Los niños con RSD requieren un esfuerzo respiratorio incrementado. El tremendo esfuerzo necesario para inflar los pulmones a menudo resulta en un ronquido, destello nasal, y una retracción subesternal que son signos físicos característicos en estos niños. El mayor gasto de energía que es requerido para respirar puede resultar en la muerte de estos neonatos prematuros débiles.

La terapia de los recién nacidos con RSD consiste básicamente en un tratamiento de sostén. Las medidas terapéuticas apuntan hacia la termorregulación, mantener al niño en un ambiente rico en oxígeno, y mantener los alvéolos abiertos artificialmente durante la respiración espontánea o asistida mecánicamente hasta que la síntesis de tensoactivo sea adecuada para una respiración no asistida.[ref\(1707\)](#) Debido a una ventilación inadecuada, pueden aparecer trastornos del estado ácido-base, los cuales se monitorean midiendo pH, PCO₂, y bicarbonato. También se acostumbra a mantener un hematocrito venoso de 40% a 45% durante la fase aguda del síndrome, con el objeto de sustentar una capacidad de transporte de oxígeno adecuada.

Se ha investigado el efecto de administrar tensoactivo pulmonar desde una fuente exógena (humana, o de mamífero, o sintetizado artificialmente) en niños con RSD. Aunque muchos estudios han demostrado alguna reducción en la mortalidad, otros no. Además, no se ha encontrado una reducción significativa en el desarrollo de secuelas tardías como la displasia broncopulmonar.[refs\(1708\)](#)

El cortisol estimula el proceso de maduración pulmonar, y se han usado clínicamente corticoides sintéticos administrados exógenamente para acelerar la maduración pulmonar



cuando el nacimiento de un niño a pretérmino es inminente.^{ref(1709)} Aún no se ha desarrollado un tratamiento ideal para niños con RSD. Pero, los esfuerzos terapéuticos obstétricos están dirigidos hacia la prevención del síndrome en niños prematuros mediante la evaluación antenatal de la maduración pulmonar. Las pruebas de líquido amniótico que evalúan la cantidad o calidad de tensoactivo presente antes del nacimiento son usadas ampliamente para el tratamiento obstétrico, debido a que la condición de síntesis de tensoactivo pulmonar y la liberación se correlacionan bien con la probabilidad de madurez pulmonar al nacer. Estos se discuten en detalle en la siguiente sección.

Trastornos hemolíticos fetales (problemas con el Rh)

La capacidad excretora del hígado no alcanza una madurez completa hasta aproximadamente la cuarta semana después del parto en el caso de niños nacidos a término. En consecuencia, antes de transcurrido dicho período, el procesamiento hepático de la bilirrubina es inferior al máximo. Cuando se requiere una velocidad de incorporación y conjugación de bilirrubina que excede la capacidad hepática para excretar la cantidad formada, como ocurre en los recién nacidos con una enfermedad hemolítica severa, la bilirrubina no conjugada se acumula en el hígado y en el suero.

La *eritroblastosis fetal* causada por incompatibilidad de antígeno Rh, entre una madre Rh negativa y un padre Rh positivo, es una causa frecuente de destrucción acelerada de glóbulos rojos. Si el feto es también Rh positivo, las células fetales que entran en la circulación materna pueden provocar una respuesta de anticuerpos contra el factor Rh sanguíneo del feto. Estos anticuerpos IgG atraviesan la placenta y destruyen los eritrocitos fetales.

El feto normalmente genera unos 35 mg de bilirrubina por catabolismo de 1 g de hemoglobina. El elevado gradiente entre las proteínas plasmáticas maternas y fetales favorece la rápida extracción transplacentaria de la bilirrubina fetal no conjugada y al mismo tiempo suprime la conjugación para formar el glucorónido a nivel del hígado fetal. La bilirrubina así transferida es conjugada y excretada por el hígado materno. Este mecanismo es sumamente eficiente, lo que explica la infrecuencia de un elevado nivel de bilirrubina en la sangre del cordón umbilical. Sin embargo, en la eritroblastosis severa, particularmente si el cuadro se acompaña de un deterioro placentario, los niveles sanguíneos de bilirrubina no conjugada pueden llegar hasta 80 mg/L. Los fetos que reciben transfusiones intrauterinas nacen a menudo con un elevado nivel de bilirrubina conjugada, probablemente como consecuencia de la estimulación de la formación fetal de glucorónido con una disminución de la permeabilidad placentaria para la bilirrubin conjugada.

Otra característica particular del recién nacido relacionada con un desarrollo inmaduro es la toxicidad tisular de la bilirrubina no conjugada, especialmente a nivel cerebral. En el adulto, la bilirrubina sérica elevada es considerada un importante indicio clínico o bioquímico de enfermedad o alteración del estado fisiológico. En el recién nacido la hiperbilirrubinemia posee una doble significación, como indicio clínico y como toxina. La bilirrubina conjugada es altamente hidrosoluble y, por lo tanto, es excretada rápidamente en los líquidos orgánicos. Por el contrario, la bilirrubina no conjugada o indirecta es insoluble en solución acuosa pero altamente soluble en lípidos. En circunstancias normales, la bilirrubina no conjugada está fijada a la albúmina plasmática, y esta fijación impide el ingreso de bilirrubina libre al sistema nervioso central rico en lípidos. Cuando se excede la capacidad de fijación de la albúmina, la



bilirrubina no conjugada pasa rápidamente hacia las células del sistema nervioso central. La bilirrubina no conjugada ejerce un efecto tóxico sobre el sistema nervioso central y provoca una necrosis, tisular, proceso patológico conocido con el nombre de “kernicterus”. Los niños que sobreviven a este síndrome pueden padecer un retraso mental, deficiencias auditivas o parálisis cerebral. Muchos niños afectados, particularmente aquellos con peso reducido al nacer, pueden mostrar una ausencia de síntomas neonatales, pero en una etapa más tardía de la infancia, pueden desarrollar problemas auditivos, trastornos de la percepción e hiperquinesis.

Usualmente no existe un nivel detectable de bilirrubina en el líquido amniótico en los casos de madre y feto normales.^{ref(1710)} Sin embargo, si el recién nacido exhibe una elevación significativa de la bilirrubina no conjugada en el suero, frecuentemente posee bilirrubina en el líquido amniótico. La vía de transferencia de la bilirrubina desde el feto hacia el líquido amniótico no se conoce con claridad.

Diabetes materna

Existe una asociación creciente de muertes intrauterinas, malformaciones congénitas y mortalidad y morbilidad perinatal en los fetos de madres diabéticas. Por esta razón, la mujer embarazada diabética debe ser controlada cuidadosamente durante todo el transcurso de su embarazo. El monitoreo es especialmente crítico en el mes inmediatamente después de la concepción, ya que manteniendo un estado euglucémico en la mujer diabética en el momento de la concepción reduce mucho la morbilidad y mortalidad fetal (ver pág. 626). El páncreas fetal no ayuda a mejorar la diabetes materna, puesto que la insulina no atraviesa la placenta.^{ref(1711)} Por lo tanto, es necesario un tratamiento con dieta e insulina exógena para el manejo del estado de deficiencia insulínica en la madre.

A medida que el tamaño de la placenta aumenta, aumentan las cantidades de lactógeno placentario humano (LPH) y otros factores que modifican o se oponen a la acción de la insulina. El lactógeno placentario humano puede ser la causa del mayor requerimiento de insulina durante el embarazo.^{ref(1712)} Oponiéndose al efecto del LPH, frecuentemente ocurre una hiperplasia de las células pancreáticas durante el embarazo, aumentando la producción de insulina materna. Por lo tanto, frente a un mayor requerimiento de glucosa por el feto, se mantiene un equilibrio normal entre la insulina y la glucosa.

Cuando no hay disponible suficiente insulina para mantener normal la homeostasis de la glucosa, se produce una hiperglucemia materna. Esto a la vez aumenta la glucemia en el feto, la cual produce una hiperinsulinemia fetal. Al nacer, cuando el feto es privado de la fuente de glucosa materna, el exceso de insulina en el recién nacido rápidamente disminuye los niveles sanguíneos de glucosa, por lo tanto el recién nacido se vuelve hipoglucémico. Las crisis hipoglucémicas que amenazan con la vida, son frecuentemente encontradas en recién nacidos no tratados de madres diabéticas. Cuando esto ocurre, se debe administrar glucosa al recién nacido hasta que pueda alcanzar un apropiado balance entre glucosa e insulina.

En embarazos complicados con diabetes, se ha notado un aumento significativo de la incidencia de RSD, aunque esto no es de un hallazgo universal.

Toxemia (enfermedad hipertensiva del embarazo)

La toxemia del embarazo se caracteriza por hipertensión (tensión arterial superior a 140/90 mm Hg), edema y proteinuria, comenzando después de las 20 semanas de gestación. La toxemia se subdivide en *preeclampsia* y *eclampsia*. La eclampsia se caracteriza por la

presencia de convulsiones y se cree que representa una secuela del estado de preeclampsia.^{ref(1713)} La hipertensión del embarazo afecta cada año aproximadamente entre 0.35 y 0.42 millones de embarazadas en los Estados Unidos, siendo esta una de las condiciones médicas más comunes asociadas con el embarazo. La preeclampsia ocurre mayormente en mujeres primerizas (aquellos con primer embarazo), las mujeres que sufren de hipertensión antes del embarazo tienen un 25% de riesgo de desarrollar preeclampsia.

Actualmente se postula que la causa que desencadena la hipertensión del embarazo sería el compromiso del flujo sanguíneo uteroplacentario.^{ref(1714)} El tratamiento de esta condición se basa en el reposo en cama, restricción de sal en la dieta, y el uso cuidadosamente controlado de sulfato de magnesio para prevenir las convulsiones eclámpicas. Como la hipertensión es un problema asociado con la implantación, la única “cura” satisfactoria es el alumbramiento y, debido a esta razón, la información relativa al estado pulmonar del feto es de considerable importancia. La frecuente asociación de la toxemia con la diabetes y con enfermedades vasculares proporciona una base para explicar la correlación entre los fetos pequeños para su edad gestacional y esta condición materna. Los exámenes de laboratorio más frecuentes para la evaluación de la toxemia consisten en las pruebas de ácido úrico sérico, creatinina y proteínas en orina. Pruebas adicionales importantes son magnesio, niveles para monitorear la terapia con sulfato de magnesio, y la prueba de la madurez pulmonar fetal.

Espina bífida y anencefalia

La espina bífida y la anencefalia representan dos defectos frecuentes del tubo neural (DTN) que constituye un importante porcentaje de las malformaciones congénitas graves del ser humano. En la espina bífida existe un defecto al nivel de la línea media espinal que provoca una protrusión de las meninges, de la médula espinal o de otros elementos neurales. En la anencefalia, el cerebro es una masa desorganizada de tejidos neurales con ausencia de cerebro anterior, meninges, bóveda craneana, y piel. La mayoría de los recién nacidos anencefálicos están muertos, y aquellos que nacen vivos tienen una sobrevivencia de solamente algunas horas.

Es posible identificar mujeres con un riesgo elevado de tener fetos con DNT por medida de los niveles de AFP séricos maternos.^{ref(1715)} Ha sido ampliamente aceptado en los Estados Unidos el *screening* en la población para DTN. En los últimos años se ha vuelto rutina el *diagnóstico* prenatal de DTN por medida de los niveles de α -fetoproteína y acetilcolinesterasa fetal específica en líquido amniótico. Aproximadamente el 80% de los casos de espina bífida y el 95% de anencefalías son detectadas por medida de α -fetoproteína sérica materna durante las semanas 16 a 18 de gestación. Además, la anencefalia afecta específicamente la formación de estriol. La ausencia de función hipofisiaria fetal y la hipoactividad adrenal y, por lo tanto los niveles reducidos de ACTH, genera una velocidad muy reducida de producción de DHEA (dehidroepiandrosterona) en la glándula adrenal fetal. Dado que este andrógeno es un precursor del estriol, los niveles de estriol se encuentran típicamente reducidos.

Síndrome de Down

El síndrome de Down, trisomía 21, es la causa genética simple más común de retardo mental con una incidencia de 1 en 800 nacimientos. En 1984 Merkatz reportó una asociación

entre la trisomía 21 y niveles séricos bajos de α -fetoproteína.^{ref(1716)} Cuando se calcula el riesgo de síndrome de Down basándose en la edad materna y los niveles maternos de α -fetoproteína, se pueden detectar aproximadamente entre un 25% y 33% de los casos de este síndrome. Se ha visto una asociación entre un alto riesgo de síndrome de Down con niveles elevados de GCH sérica materna y niveles disminuidos de E_3 no conjugada.^{ref(1717)} Son usadas en un tamizaje protocolar las medidas de estos tres analitos y la edad materna para aumentar el grado de detección del síndrome de Down a aproximadamente 67%.

Embarazo tubario

Generalmente la fecundación ocurre en las trompas de falopio. En circunstancias normales, el óvulo fecundado migra a través de la trompa, ingresa al útero y se implanta. Ocasionalmente, la implantación ocurre fuera del útero, más comúnmente en la trompa de falopio propiamente dicha. Cualquier implantación fuera del útero es llamado *embarazo ectópico*, y cuando la implantación se produce en la trompa, es denominado *embarazo tubario*. Las causas de un embarazo ectópico pueden ser desequilibrios endocrinos, efectos residuales como consecuencia de infecciones tubulares, o movimiento retrógrado del embrión desde el útero hacia la trompa de falopio.^{ref(1718)}

Los síntomas clínicos incluyen dolor abdominal inferior y hemorragia vaginal. La amenorrea no es un rasgo característico de este cuadro. Los embarazos tubarios usualmente arrojan una prueba positiva de embarazo antes de la ruptura de la trompa. Sin embargo, debido a que una placenta comprometida, (es decir, una placenta en estado de degeneración o que penetre la pared tubaria), no es capaz de producir GCH en cantidades normales, las pruebas de embarazo pueden ser negativas y conducir a una interpretación errónea del cuadro. El procedimiento recomendado para el diagnóstico de un embarazo ectópico incluye una prueba de embarazo cualitativa (para detectar tejido trofoblástico y embarazo), seguido por varias medidas cuantitativas de los niveles de GCH sérica, progesterona sérica, y un ultrasonido transvaginal para visualizar el embarazo. Como generalmente los niveles de GCH se doblan cada 2 días, un tiempo más largo para alcanzar estos valores puede aumentar la probabilidad de embarazo ectópico. Los niveles séricos de progesterona reflejan la actividad del cuerpo amarillo, y niveles altos pueden ser usados para descartar un embarazo ectópico, mientras que niveles muy bajos pueden identificar un embarazo no viable. Ya que un embarazo ectópico puede amenazar la vida, estas pruebas de laboratorio deben estar disponibles rutinariamente en áreas con una alta incidencia de embarazos ectópicos.^{ref(1719)}

Cambio de Compuesto Analizado en la Enfermedad

En los últimos 20 años se han logrado importantes progresos en la comprensión de los mecanismos de crecimiento y desarrollo fetal. Parte de estos nuevos conocimientos han sido posibles a través del desarrollo y la aplicación de técnicas analíticas más modernas y a la mayor seguridad obtenida con la amniocentesis con ultrasonografía. La aplicación de estos conocimientos ha modificado considerablemente el manejo de los embarazos problemáticos o de “alto riesgo”. La Fig. 40-12 ofrece una ilustración de la técnica de la amniocentesis y la Fig. 40-13 indica la amplia gama de sus aplicaciones.



Existen tres áreas clínicas principales que se han beneficiado con el empleo de la amniocentesis: (1) el tratamiento de la incompatibilidad por antígeno Rh entre la madre y el feto, (2) la identificación del momento más temprano del embarazo en el que el parto puede ser inducido con un riesgo mínimo de inmadurez pulmonar, y (3) la identificación de trastornos genéticos potenciales. Los trastornos genéticos se discuten en el capítulo 47.

Gonadotropina coriónica humana

La gonadotropina coriónica humana es usada para seguir el curso del embarazo e identificar cualquier patología del trofoblasto. En un embarazo normal, los niveles urinarios de GCH se elevan hasta un intervalo de 20.000 a 100.000 U/día y luego disminuyen a valores que oscilan entre las 4.000 y las 11.000 U/día en una fase más avanzada del embarazo. El embarazo puede ser detectado mediante la GCH urinaria una semana después de la ausencia de período menstrual. Mediante ensayos de determinación de la GCH plasmática, particularmente con métodos sensibles y específicos como los basados en las cadenas β de la GCH, el embarazo puede ser detectado unos pocos días después de la concepción. En los casos de mola hidatiforme, los títulos urinarios de GCH se elevan hasta más de 300.000 U/día. Después de la evacuación de la mola, estos valores descienden en el transcurso de 1 mes y, en aproximadamente el 90% de los casos, la GCH no es detectable en orina después de 3 meses. En los casos en los que existe tejido trofoblástico residual, como en el coriocarcinoma retenido, los valores de GCH permanecen elevados y los ensayos seriados en orina o suero son de gran utilidad para determinar los resultados del tratamiento, el cual consiste usualmente en la quimioterapia.

Desde el punto de vista molecular, la GCH muestra una actividad tirotrófica equivalente a 1/4000 de la actividad de la TSH hipofisiaria. Si los niveles de GCH son muy elevados, es posible que exista una actividad estimulante de la tiroides. Por esta razón, los niveles de GCH alcanzados en los embarazos molares son considerados la causa del hipertiroidismo a menudo asociado con estos embarazos. Con niveles de GCH que superan las 100.000 U/día en orina o las 300U/mL en suero, es posible sospechar la presencia de una asociación entre mola hidatiforme e hipertiroidismo.

Los niveles de GCH a menudo están reducidos en relación con la edad gestacional en los casos de embarazos ectópicos. Las pruebas de diagnóstico de embarazo han demostrado ser positivas solamente en un 50% de embarazos ectópicos. Por consiguiente, la obtención de un resultado negativo no excluye la posibilidad de un embarazo ectópico. Inmunoensayos nuevos más sensibles pueden mejorar el diagnóstico de embarazos ectópicos. Niveles cuantitativos de GCH consecutivos que muestren un tiempo de duplicación significativamente menor que 48 horas son fuertemente sugestivos de un embarazo ectópico. [ref\(1720\)](#) Niveles séricos bajos de GCH materna se asocian también con la trisomía fetal 18, una condición letal en la cual un 75% de los fetos afectados se pierden en el tercer trimestre. [ref\(1721\)](#) Se ha visto que a diferencia de la trisomía 18, en la trisomía 21 (síndrome de Down) los niveles séricos maternos de GCH aumentan.

[efs\(1722\)](#) Además, se han visto abortos completos en mujeres con un diagnóstico de amenaza de aborto con niveles bajos de GCH para el tiempo de gestación estimado.

Lactógeno placentario humano



El crecimiento fetal esta estrechamente asociado con el crecimiento de la placenta y por lo tanto con el LPH, el cual es sintetizado por los sincitotrofoblastos placentarios. Los niveles séricos de LPH se relacionan con la masa placentaria (Fig. 40-14), pero el LPH no es enteramente satisfactorio como una medida clínica de función placentaria saludable debido a que existe un amplio intervalo de valores normales a medida que el embarazo avanza. El LPH no se emplea en el seguimiento de la enfermedad trofoblástica metastática debido a la cantidad escasa de LPH en relación con las concentraciones más elevadas de GCH. Sin embargo, puede contribuir para identificar una población de riesgo de mortalidad perinatal. Carl y col. propusieron un modelo matemático basado en una modificación de la ecuación de Gompertz para pronosticar los niveles de LPH en embarazos normales, tomando en cuenta factores tales como, altura materna, concentraciones de hemoglobina, y si es fumadora.[ref\(1723\)](#)

Estriol

Los valores séricos o urinarios reducidos de estriol, o, lo que es más importante aun, la tendencia a la declinación de estos valores, implica un pronóstico desfavorable[ref\(1724\)](#) (ver Fig. 40-5, que ilustran los valores seriados de estriol durante diferentes embarazos). En líneas generales, puede establecerse que una disminución del 30% a 50% con respecto a la medida obtenida en los 3 días previos indica una situación de riesgo para el feto. Debido a las pronunciadas variaciones diurnas en lo que respecta a la formación de estrógenos, mantener el momento del día en el que se obtiene la muestra es importante (particularmente cuando se miden los niveles de estrógeno en orina). Dado que los precursores del estriol, son andrógenos producidos por la glándula adrenal fetal, drogas como los corticoides sintéticos, capaces de atravesar la placenta y suprimir la secreción de ACTH, provocan una disminución de los niveles de estriol tanto en sangre como en orina.

La presencia de niveles séricos o urinarios de estriol que superen el porcentaje del 95% deben orientar hacia la posibilidad de gemelos. Los valores de estriol permiten predecir con bastante certeza la probabilidad de muerte fetal en los casos de enfermedad hipertensiva, enfermedad renal, y diabetes. Las condiciones asociadas con valores séricos de estriol crónicamente reducidos incluyen toxemia, anencefalia, deficiencia de sulfatasa placentaria, síndrome de Down, y trisomía 18.[refs\(1725\)](#) Los estrioles no son de utilidad en la evaluación de la eritroblastosis fetal.

Pruebas de la maduración pulmonar fetal

Los obstetras utilizan las pruebas prenatales de laboratorios de madurez pulmonar fetal (MPF) para predecir la probabilidad de RSD subsiguiente al parto. Típicamente estas pruebas incluyen evaluaciones bioquímicas y biofísicas del líquido amniótico para la presencia de componentes tensoactivos derivados de la maduración pulmonar fetal. Estas pruebas han sido diseñadas para cuantificar tensoactivos específicos asociados con fosfolípidos (enfoque bioquímico) ,o para medir los efectos de superficie de estos componentes tensoactivos pulmonares en la muestra de líquido amniótico (enfoque biofísico). Se han desarrollado otros métodos que parecen no adaptarse a ninguno de estos grupos. A través de los años, se han desarrollado un enorme número de métodos de MPF, aunque la mayoría de estos nunca han ganado la aceptación generalizada para el uso rutinario. Se describen abajo algunos de estos métodos más populares, o prometedores.



Pruebas bioquímicas

Prueba de la relación lecitina/esfingomielina (RLE).

Gluck y Kulovich^{ref(1726)} fueron los primeros en correlacionar las concentraciones relativas de lecitina y esfingomielina en el líquido amniótico con el estado funcional del pulmón fetal, y esta relación (RLE) que ellos describieron fue la primer prueba de laboratorio para la madurez pulmonar fetal que fue ampliamente aceptada. Más bien que cuantificar directamente lecitina y esfingomielina, la prueba es usada para determinar la relación de estos compuestos luego de una cromatografía de capa fina (TLC). Este enfoque semicuantitativo fue diseñado para proveer análisis más rápidos que la TLC cuantitativa, para ser relativamente independiente de las variaciones usuales y a veces significativas del volumen de líquido amniótico durante el embarazo, y para disminuir los efectos de las variaciones en las pequeñas extracciones de lípidos. Usando los métodos de TLC de los tipos originalmente propuestos por Gluck, los valores de RLE de 2 o más se correlacionaban con madurez pulmonar fetal. Antes de las 34 semanas de gestación, la lecitina y la esfingomielina están presentes en el líquido amniótico en aproximadamente iguales cantidades, pero cerca de la semana 34 la concentración de lecitina comienza a crecer rápidamente comparado con la esfingomielina. Cuando la concentración de lecitina en el líquido amniótico se vuelve al menos dos veces que la de esfingomielina, la probabilidad de dificultad respiratoria después del parto es mínima. Debido a que informes recientes sugirieron que hay un mayor riesgo de RSD asociado con embarazadas diabéticas, se usan en ellas valores de 2.5 o mayores. La validez de este enfoque ha sido cuestionada por algunos autores, sin embargo, en muchos estudios recientes no se han observado diferencias relacionadas con la edad gestacional consistentes con los resultados de RLE entre embarazadas diabéticas y no diabéticas.^{ref(1727)} La predicción clínica de la RLE, como muchas pruebas MPF, varía ampliamente. La sensibilidad y especificidad para esta prueba varía entre 80% y 85%. Esta variabilidad probablemente es el resultado de una estandarización analítica pobre, diferencias en poblaciones, falla inherente de consistencia en los diagnósticos de RSD, y el uso de diferentes valores de referencia.

Gluck y Kulovich^{ref(1728)} y otros autores han observado que en ciertas condiciones gestacionales patológicas, la maduración pulmonar parece estar acelerada, mientras que en otras condiciones parece hallarse retardada. Las enfermedades en las que la maduración pulmonar fetal puede estar retardada incluyen la diabetes mellitus y la enfermedad hemolítica fetal. La hipertensión materna, y la ruptura prematura de membranas con un parto retardado, en estas condiciones se ha registrado una aceleración de la maduración pulmonar como consecuencia de la producción de agente tensoactivo por el pulmón fetal. Sin embargo, la naturaleza exacta y la extensión de los efectos de estas y otras complicaciones maternas y fetales sobre los resultados obtenidos por la RLE y otras pruebas MPF permanecen en su mayoría como especulativos.

Los factores patofisiológicos que alteran el valor total de la maduración pulmonar podrían afectar estos procesos individualmente y en alcances diferentes. Este efecto se debería a una aparente descordinación en la síntesis de fosfolípidos y el resultado clínico. Un concepto emergente es que las pruebas de MPF miden el tensoactivo, pero la maduración fetal requiere: (1) producción y liberación del tensoactivo, y (2) desarrollo morfológico del tejido pulmonar (diferenciación, similar a la producción de tejido conectivo y la vascularización

pulmonar). Los procesos (1) y (2) están generalmente sincronizados; sin embargo, algunos estados de enfermedad pueden producir que el desarrollo morfológico ocurra más rápido o más lento que el desarrollo del tensoactivo. En estos casos, las pruebas de MPF, que miden solamente un componente de este proceso (liberación de tensoactivo), pueden no reflejar correctamente el estado pulmonar fetal. Como un ejemplo, la administración de β -metasona entre las 30 y 32 semanas gestacionales puede promover la maduración que se evidencia por una disminución de la incidencia de RDS. Sin embargo, las pruebas estándares de MPF no reflejan ningún cambio con los niveles de pretratamiento. Se cree que el efecto de la β -metasona es mayor sobre el desarrollo morfológico y secundariamente sobre el aumento de la síntesis de tensoactivo. Este concepto es importante porque marca que la maduración pulmonar es un proceso muy complicado con muchos factores interrelacionados y no simplemente la liberación de tensoactivo. En situaciones donde las alteraciones en los factores morfológicos eran predominantes en el proceso de maduración pulmonar, la relación entre los resultados de las pruebas de MPF y el estado de desarrollo pulmonar fetal podría alterarse tanto que las pruebas basadas en el tensoactivo pierden su usual importancia. En este caso, el uso de valores de referencia de MPF alterados, habituales para los casos de diabetes y otras enfermedades maternas o fetales, no tendrían fundamento a menos que puedan determinarse la naturaleza y el alcance de las alteraciones específicas relacionadas con el tensoactivo.

La contaminación de las muestras con sangre tiende a producir valores falsamente elevados para muchas muestras inmaduras y valores falsamente bajos para muestras maduras. La contaminación con meconio, secreción vaginal, y orina materna pueden también producir resultados falsos. También se puede desarrollar RSD en un neonato asfiriado, a pesar de un RLE maduro.

La RLE fue el primer procedimiento de laboratorio designado para evaluar directamente la madurez pulmonar fetal, y principalmente debido a este hecho histórico, ha sido considerada por muchos la prueba "estándar" para la madurez pulmonar fetal. A través de los años, sin embargo, se han propuesto numerosas modificaciones del procedimiento original en el esfuerzo para superar las deficiencias prácticas y analíticas percibidas. Esta actividad ha conducido al desarrollo de muchos métodos de TLC diferentes para determinar la relación entre lecitina y esfingomielina en el líquido amniótico, cada uno de los cuales producirían valores sustancialmente diferentes. Hasta ahora, no hay un método estándar para la RLE, y persisten muchos problemas, incluyendo la pobre reproducibilidad inter e intralaboratorio y el excesivo tiempo de análisis. Además, hay aún muchas preguntas no resueltas a cerca de componentes específicos del procedimiento general como ser la extracción de fosfolípidos, el sistema de solventes de la TLC, el soporte de la TLC, y los sistemas de detección (ver más adelante).

Debido a que se cree que la prueba de RLE es menos exitosa en predecir la madurez pulmonar fetal en embarazadas diabéticas, se han desarrollado pruebas para otros lípidos tensoactivos activos o proteínas tensoactivas para usar conjuntamente con la RLE o como pruebas independientes. Estos esfuerzos para mejorar la confiabilidad clínica de la RLE han conducido al desarrollo del "perfil pulmonar", [refs\(1729\)](#) el cual consiste en la determinación de TLC bidimensional e interpretación combinada de la RLE, fosfatidilglicerol (FG), fosfatidil-inositol, y el porcentaje de lecitina precipitable con acetona. Los mejoramientos marginales en la confiabilidad clínica asociados con este método pueden ser contrarrestados



por tiempos de análisis extremadamente largos y altos niveles de pericia técnica.

Fosfatidilglicerol.

Debido a que el FG contribuye a las propiedades funcionales del tensoactivo, las pruebas para este fosfolípido se vuelven útiles como un complemento de la RLE. La madurez funcional del pulmón se asocia claramente con las cantidades cuantificables de FG; [ref\(1730\)](#) sin embargo, la ausencia de FG no significa necesariamente que la RSD es inevitable. La experiencia colectiva con la prueba de FG indica que, considerando que el valor predictivo de FG es aproximadamente 100% para la madurez pulmonar, en tanto que el valor predictivo negativo de FG para establecer una RDS puede ser tan bajo hasta ser no reportable. Como el FG sería un constituyente muy pequeño de la sangre, la medida de él es especialmente valioso cuando el estado pulmonar fetal debe determinarse en muestras de líquido amniótico contaminadas con sangre o meconio. La medida de FG es también considerada importante cuando uno está evaluando la madurez de fetos de madres diabéticas, ya que la RLE y otras pruebas MPF pueden ser menos confiables en estos casos. Cuando el líquido amniótico es obtenido desde la salida en la vagina que es la muestra más fácilmente accesible, el FG es el único fosfolípido que debe ser medido. Si se obtiene un apropiado pool de muestra vaginal, son escasos los resultados falso-positivos, aunque han habido algunos informes de producción local de FG por flora vaginal. Deben obtenerse los valores de creatinina o urea en las muestras vaginales sospechosas de estar fuertemente contaminados con orina materna para ayudar a determinar la naturaleza de la muestra. Se ha medido el fosfatidilglicerol procedimientos de TLC monodimensional o bidimensionales aunque insumen mucho tiempo y algunos métodos de TLC pueden estar sujetos a la migración con otros fosfolípidos o sustancias interferentes con la mancha de FG. [ref\(1731\)](#) Más recientemente se ha vuelto popular un ensayo de aglutinación para el FG (AminoStat-FLM, Irvine Scientific, Irvine, California). Esta prueba emplea antisuero específico para FG, puede ser aplicada a muestras recogidas vaginalmente, y es rápida y relativamente simple de desarrollar.

Ensayos biofísicos.

Los métodos en este grupo fueron originalmente subclasificados porque ellos fueron diseñados para medir alguna propiedad biofísica específica del tensoactivo pulmonar en muestras de líquido amniótico. Como fue mencionado recientemente por Dubin, [ref\(1732\)](#) sin embargo, a través del tiempo, esta clasificación ha venido a incluir un grupo de ensayos diferentes que tienen en común la propiedad primaria de no adaptarse a la categoría bioquímica. Ellos son generalmente más fáciles, rápidos, y baratos de realizar que las técnicas tradicionales de TLC.

Ensayos de estabilidad de la espuma.

La prueba de agitación y la prueba de índice de estabilidad de la espuma (FSI) se basan en las observaciones de que, el etanol actúa como un tensoactivo antiespuma competitivo, que supera los efectos de estabilidad de la espuma de la mayoría de los tensoactivos no pulmonares en el líquido amniótico. Los fosfolípidos tensoactivos pulmonares, sin embargo, son capaces de producir una tensión superficial menor de 29 dinas/cm, permitiendo así la formación de espuma estable en la solución alcohólica luego de una vigorosa agitación. Esta es la base para la prueba de agitación semicuantitativa desarrollada por Clements y colaboradores [ref\(1733\)](#) para



evaluar la madurez pulmonar fetal. El punto final de esta prueba es la formación de un anillo continuo de burbujas en el menisco de un tubo que fue agitado vigorosamente y que contiene volúmenes iguales de etanol 95% (v/v) y líquido amniótico. Este valor fue aproximadamente equivalente a 30 mg de dipalmitoil fosfatidilcolina por litro, y se encontró altamente predictivo de MPF. En 1978, Sher y col.[ref\(1734\)](#) informaron una modificación de la prueba de agitación original, llamada el “índice de estabilidad de la espuma” (FSI), que permitía la medida semicuantitativa de cantidades variantes de tensoactivo, fundamentalmente dipalmitoil fosfatidilcolina, en concentraciones oscilando desde 15 a 30 mg/L. El desempeño clínico informado de esta prueba es bastante bueno. La FSI, que es simple y rápido de desarrollar, está comercialmente disponible bajo la forma de prueba de Lumadex-FSI (Instrumentos Beckman, Inc., Brea, CA 92621). Las desventajas de esta prueba incluyen la naturaleza subjetiva de la espuma leída y la susceptibilidad de la prueba a una amplia variedad de contaminantes que producen espuma. Debido a esto, se debe tomar particular cuidado para asegurar que los recipientes de vidrio donde se efectúa la prueba estén limpios y los reactivos y las muestras de líquido amniótico no estén contaminadas con sangre, meconio, número excesivo de leucocitos, o secreciones vaginales.

Ensayos de polarización de fluorescencia.

Las evaluaciones de MPF usando el método de microviscosidad de polarización de fluorescencia fueron descritas primero por Shinitzky y col.[ref\(1735\)](#) El análisis real es conducido por el uso de un microviscosímetro llamado el analizador de la madurez pulmonar fetal (FELMA, por sus siglas en inglés), (Elscent, Inc., Hackensack, NJ 07602) diseñado específicamente para esta prueba. Aunque descrito primero en 1976, el alto costo del instrumento y los problemas prácticos con este ensayo en particular han resultado en lograr una popularidad limitada como una prueba de rutina para la madurez pulmonar fetal. El ensayo de Madurez Pulmonar Fetal TDx o FLx (TDx-FLM) es un ensayo de polarización de fluorescencia diseñado para usar sobre el analizador TDx de Abbott (Abbott Laboratories Diagnostics Division, Irving, TX 75015). Esta prueba emplea una sonda fluorescente única (PC16)[ref\(1736\)](#) que, cuando se le agrega al líquido amniótico, se reparte entre la albúmina endógena (polarización de fluorescencia alta) y el fosfolípido tensoactivo (polarización de fluorescencia baja). La medida de polarización total por el analizador refleja la relación de tensoactivo a albúmina en la muestra, y este valor es altamente correlativo con la madurez pulmonar. Evaluaciones clínicas recientes demostraron una sensibilidad y especificidad para esta prueba igual o mayor que la de la RLE.[ref\(1737\)](#) La prueba es precisa y cuantitativa, emplea reactivos normalizadores y calibradores, requiere una preparación y volumen de muestra mínimo, y puede desarrollarse en menos de 30 minutos.

Cuerpos lamelares.

Como los cuerpos lamelares (CLs) son la forma estructural del tensoactivo pulmonar liberado por los neumocitos tipo II, la concentración de ellos en el líquido amniótico ha sido evaluado para usar en las pruebas de MPF. Los enfoques anteriores eran generalmente basados en la ultracentrifugación para separar la fracción de CLs de la muestra seguido por una cuantificación del contenido de fosfolípido en esta fracción.[ref\(1738\)](#) Aunque el desempeño clínico de este enfoque era generalmente bastante bueno, los requerimientos de hardware y la complejidad de procesamiento excedió las capacidades de la mayoría de los laboratorios



clínicos.

Más recientemente, Dubin ha informado sobre la medida de los CLs por un índice refractario correlacionando a la fracción anómala (RIMAD)^{ref(1739)} con técnicas por conteo de pulsos.^{ref(1740)} La técnica RIMAD consiste en la medida de la diferencia de la densidad óptica del líquido amniótico diluido 1:2 con glicerol (cubeta de referencia) y con solución salina (cubeta de prueba). La difracción de la luz ocasionado por los CLs ocurre en la cubeta de prueba, pero no en el blanco de glicerol porque el índice de refracción del glicerol se equipara muy estrechamente al de los CLs. Como la absorbancia de luz de los cromógenos comunes, como pigmentos de meteno, es independiente del índice de refracción, cualquier interferencia debería ser igual en ambas cubetas la de referencia y la de prueba, y debería ser corregida en un espectrofotómetro de haz dual. El efecto neto es un incremento en la absorbancia medida a 650 nm manifestándose solo en el esparcimiento de luz. Usando la diferencia de absorbancia (A) el criterio de $A = 0.056$, esta prueba muestra una buena correlación entre la densidad numeral de CLs (DNCL) y la maduración pulmonar fetal.^{ref(1741)} La cuantificación de la DNCL por técnicas de conteo por pulso usando el canal base del contador de células comercial también representa un enfoque prometedor para las pruebas de MPF. Los valores de DNCL de 40,000 g/mL y 26,000 g/mL, en muestras no centrifugada y centrifugada respectivamente, demuestran una fuerte concordancia predictiva con otras medidas aceptadas de MPF.^{ref(1742)} Este método posee las ventajas de una pequeña preparación de la muestra, relativa no-interferencia de sustancias interferentes comunes, y desarrollo rápido y semiautomatizado. Debido a su procedimiento simple y rápido, los procedimientos de CLs aquí descritos parecen ser útiles en los tamizaje iniciales de MPF.

Estrategias para pruebas de MPF.

Aunque los procedimientos bioquímicos y biofísicos para la MPF pueden dar información clínica confiable si son desarrollados adecuadamente, debido a la bajo prevalencia de RDS, hay una alta proporción de predicciones falso-positivas de inmadurez a lo largo de la gestación para todas las pruebas de MPF. Viendo esta realidad, se han desarrollado pruebas de estrategias con el propósito de mejorar el valor predictivo de los resultados de las pruebas que son positivos para la inmadurez respiratoria.^{refs(1743)} Tales estrategias confían fuertemente en la disponibilidad de métodos rápidos para la MPF que pueden desarrollarse en una forma secuencial, o en cascada, sin alargar considerablemente el tiempo total de los resultados. Típicamente las pruebas más fáciles y rápidas se realizan primero, seguido de pruebas adicionales hasta que se obtenga el primer resultado maduro o que todas las pruebas de la cascada indiquen inmadurez. Ocasionalmente hay una necesidad clínica de estar relativamente seguros de que la RSD no ocurrirá luego del parto que puede demorarse si fuese necesario. En estos casos, son empleados para mejorar el valor predictivo de los resultados de las pruebas, los requerimientos de múltiples resultados maduros que indiquen la madurez fetal, valores altos de referencia, o marcadores que sean positivos solamente después que la madurez fetal está bien establecida, como el FG.

Bilirrubina (ΔA_{450})

Un título de anticuerpos maternos (prueba de Coombs indirecta) de 1 a 16 o más es una indicación para efectuar la amniocentesis en la mayoría de los casos y determinaciones

1665

apropiadamente seriadas de bilirrubina en el líquido amniótico. La absorción de bilirrubina, cuando es determinada con un espectrofotómetro de registro continuo, aparece como una “giba” o inflexión, con absorción máxima a 450 nm (Fig. 40-15). La magnitud del aumento de densidad óptica por encima del valor basal (ΔA_{450}) usualmente, aunque no siempre, se correlaciona en forma adecuada con la intensidad de la enfermedad hemolítica para cualquier edad gestacional considerada.

Liley^{ref(1744)} diseñó un gráfico capaz de predecir en forma razonable la severidad de la enfermedad y la recomendación de tratamiento clínico (Fig. 40-16). Cuanto mayor es el nivel de (ΔA_{450}), más severa será la enfermedad hemolítica, de acuerdo con la edad gestacional. En general, una tendencia declinante de la bilirrubina del líquido amniótico indica que el feto sobrevivirá, y una bilirrubina creciente u horizontal señala una eritroblastosis fetal severa. La principal fuente de error está representada por el feto con polihidramnios, dado que en estos casos es posible obtener valores falsamente reducidos de bilirrubina. Además, la hiperbilirrubinemia materna o la enfermedad de la célula en hoz pueden dar elevaciones de la bilirrubina en el líquido amniótico en ausencia de enfermedad hemolítica fetal.

En los casos de eritroblastosis severa, es posible detectar niveles de bilirrubina de 45 a 60 mg/L y ocasionalmente hasta de 80 mg/L. Estos niveles son importantes para adoptar la decisión acerca del empleo inmediato o posterior de transfusiones sanguíneas de intercambio. En los recién nacidos que reciben transfusiones intrauterinas no es infrecuente observar una elevación significativa de los niveles de bilirrubina directa.

Glucosa (ver pág. 626)

Después del parto, la concentración de glucosa en los niños de madres diabéticas declina rápidamente hasta niveles inferiores a los detectados en niños normales. Los niveles de glucemia de estos niños deben ser cuidadosamente monitoreados para ver si ocurre hipoglucemia que amenace con la vida. Aproximadamente un 60% de los niños de madres diabéticas insulino-dependientes exhiben una glucemia inferior a 300 mg/L en las primeras 6 horas de vida.^{ref(1745)}

Pruebas de la función renal (ver pág. 493)

Durante el embarazo normal, el flujo sanguíneo renal y el índice de filtración glomerular se encuentran significativamente aumentados con respecto a los niveles observados en mujeres no embarazadas. Con el desarrollo de la hipertensión inducida por el embarazo, la perfusión renal y la filtración glomerular sufren una reducción. Por lo tanto, en la mayoría de los casos, la concentración plasmática de creatinina o de urea no está elevada en forma apreciable. La concentración plasmática de ácido úrico está aumentada con mucho mayor frecuencia, especialmente en mujeres con enfermedad renal más severa. Esta elevación es principalmente el resultado de la disminución de la depuración renal del ácido úrico, disminución que excede la reducción del índice de filtración glomerular y de la depuración de creatinina.

α -Fetoproteína

La α -fetoproteína (AFP) es una glicoproteína con un peso molecular de aproximadamente 68,000 daltones y con propiedades fisicoquímicas similares a la albúmina. Se ha identificado muchas isoformas de la AFP, aún no ha sido determinada su relevancia clínica. Se especula que las isoformas individuales pueden estar asociadas con las fases del desarrollo, enfermedad neoplásica, enfermedad congénita, y una variedad de procesos bioquímicos. A diferencia de otros compuestos analizados, las elevaciones o disminuciones en los niveles de la AFP no confirman directamente un proceso patológico. Sin embargo, este compuesto es el único que identifica pacientes con riesgo de tener fetos con una variedad de defectos de nacimiento, así como también enfermedad maligna en hombres y mujeres no embarazadas. [ref\(1746\)](#)

Niveles séricos maternos de AFP elevados están asociados con un aumentado riesgo para NTDs, mientras que niveles disminuidos están asociados con un aumentado riesgo para síndrome de Down. Sin embargo, a causa de que los niveles maternos de AFP dependen de numerosos factores, incluyendo la edad gestacional, peso y edad materna, raza, diabetes insulino-dependiente, embarazos múltiples, e ingestión de drogas, los resultados no son diagnósticos. Así, los niveles séricos maternos de AFP son más útiles en identificar aquellas mujeres embarazadas que requieran pruebas adicionales (como ultrasonido y amniocentesis) para excluir la posibilidad de un feto afectado.

Los resultados de AFP son rutinariamente informados como un múltiplo de la media normal (MoM) para la semana gestacional, una vez que se han normalizado para los factores mencionados arriba. La espina bífida, anencefalia, gastroquisis, y onfalocele están entre los diagnósticos diferenciales a las 15 o 20 semanas de gestación cuando los niveles de AFP maternos y del líquido amniótico están por arriba de 2.0 MoM y los niveles de acetilcolinesterasa del líquido amniótico están aumentados. Cuando existe un riesgo incrementado debido a la edad materna y los niveles séricos maternos de AFP son menores de 0.4 MoM, se sospecha síndrome de Down. Niveles séricos maternos disminuidos de estriol no conjugado y niveles aumentados de GCH también están asociados con el síndrome de Down. Se ha visto que para el tamizaje de síndrome de Down es mejor el tamizaje de marcadores múltiples, incluyendo AFP sérica materna, GCH, y estriol no conjugado, que el uso de niveles séricos maternos de AFP solamente. [ref\(1747\)](#)

Magnesio

Las mujeres con toxemia de embarazo o labor prematura son a menudo tratadas con niveles altos de sulfato de magnesio (MgSO_4). Estas mujeres, generalmente internadas en hospital, deben ser monitoreadas estrechamente para una excesiva hipermagnesemia (>80 mg/L).

Métodos de Análisis

Bilirrubina en el líquido amniótico

Steven C. Kazmierczak

Principios del análisis.

La concentración de bilirrubina no conjugada en el líquido amniótico es relativamente

baja en embarazos normales.^{ref(1748)} Sin embargo, las concentraciones de bilirrubina en el líquido amniótico pueden incrementar significativamente en los casos de síndrome de aloinmunización. La absorbancia máxima de la bilirrubina se da a aproximadamente los 450 nm, y la magnitud de este pico en un barrido de absorbancia del líquido amniótico ha mostrado ser predictivo de la eritroblastosis fetal. La aplicación clínica de la importancia de la diferencia en la absorción de líquido amniótico a 450 nm para la evaluación de pacientes inmunizadas por Rh fue popularizada por Liley^{ref(1749)} (Tabla 40-2, método 1).

Como la concentración de bilirrubina en un embarazo normal es extremadamente baja, un espectro de absorbancia de líquido amniótico obtenido de una embarazada sana nos dará una línea aproximadamente derecha cuando se barre entre las longitudes de onda de 365 y 550 nm. Si en los equipos no se puede realizar un barrido continuo entre estas longitudes de onda, la absorbancia puede ser leída a 365, 415, 450, y 515 nm. Luego se construye una línea derecha cuando se conectan los puntos. Como la concentración de bilirrubina en el líquido amniótico aumenta, se ve un pico a 450 nm en el espectro de absorbancia, siendo la altura del pico proporcional a la bilirrubina presente. Liley^{ref(1750)} desarrolló una gráfica en la cual se grafica la edad gestacional contra la absorbancia neta del líquido amniótico obtenida a 450 nm. Puede usarse para evaluar la severidad de la enfermedad hemolítica la determinación de la localización de la intersección de la edad gestacional y la absorbancia neta a 450 nm (expresada como ΔOD a 450 nm).

Pueden ocurrir interferencias en el método espectrofotométrico directo si están presente en la muestra la hemoglobina o el meconio. La contaminación con oxihemoglobina provoca picos de absorbancia a 412, 540, y 575 nm; mientras que la presencia de meconio en el líquido amniótico podría dar un aumento de la absorbancia en la región de 350 a 400 nm y disminución de la absorbancia a longitudes de onda mayores. La interferencia atribuible a la presencia de meconio puede dar un valor inexacto bajo de bilirrubina. Si la muestra contiene glóbulos rojos intactos, debería ser centrifugada tan pronto como sea posible para remover las células antes que se hemolisen. En vivo, la hemoglobina y sus productos de degradación metahemoglobina y metalbúmina, así como también el meconio llevan aproximadamente entre 2 a 3 semanas para aclararse del líquido amniótico.^{ref(1751)} La biliverdina, que es un producto de oxidación de la bilirrubina producido en el intestino, también puede manchar el líquido amniótico si el meconio es excretado hacia el líquido amniótico. La interferencia de la biliverdina puede ser superada con el uso de extracción con cloroformo. La concentración de biliverdina en el líquido amniótico puede también ser estimada por medida de la diferencia de absorción a 480 y 500 nm.^{ref(1752)}

Para evitar la interferencia resultante de la presencia de sangre o meconio en el líquido amniótico, se han introducido modificaciones a la espectrofotometría directa por medio del cual las muestras contaminadas son extraídas con cloroformo (Tabla 40-2, método 2).^{ref(1753)} El uso de un solvente orgánico como el cloroformo permite separar la bilirrubina de otros pigmentos interferentes. La bilirrubina es rápidamente soluble en el cloroformo, mientras que los contaminantes como el meconio y la sangre son más solubles en agua y por lo tanto permanecen en la solución acuosa. Una simple extracción con un solvente orgánico como el cloroformo puede recuperar cerca del 90% de la bilirrubina presente en la muestra.

Muestra.

Como la exposición a la luz puede causar una disminución en la bilirrubina, las



muestras de líquido amniótico deben ser protegidas de la luz antes del análisis. El líquido amniótico es normalmente turbio. La turbidez es el resultado del material celular y otros desechos. La turbidez puede ser reducida por centrifugación de la muestra antes del análisis. Si el líquido aún permanece turbio después de la centrifugación, puede ayudar a la clarificación de la muestra una filtración a través de una papel de filtro Whatman N.42.

El líquido amniótico es estable e temperaturas de refrigeración por más de 24 horas. Si el análisis se va a demorar por más tiempo, la muestra debe ser congelada. Las muestras congeladas, si son centrifugadas antes del congelamiento, pueden ser almacenadas por meses. [ref\(1754\)](#)

Intervalo de referencia.

El cambio de absorbancia a 450 nm (ΔOD 450) provocado por la presencia de bilirrubina depende de la edad gestacional. Una gráfica desarrollada por Liley [ref\(1755\)](#) grafica la edad gestacional versus el cambio de absorbancia a 450 nm provocado por la presencia de bilirrubina y permite evaluar la severidad de cualquier enfermedad hemolítica.

Evaluación de la madurez pulmonar fetal: análisis de líquido amniótico, relación lecitina-esfingomielina, fosfatidil glicerol

Steven C. Kazmierczak

Principio del análisis.

Las medidas de tensoactivo pulmonar para evaluar la MPF pueden ser categorizada de acuerdo a que parámetro del tensoactivo está siendo evaluado. Las pruebas que miden los constituyentes químicos del tensoactivo incluyen la relación L/E, el perfil de fosfolípidos, y la composición de ácidos grasos de la lecitina del líquido amniótico. [refs\(1756\)](#) Los métodos que miden las propiedades física del tensoactivo pulmonar, lo que refleja la composición química del líquido amniótico, incluyen análisis de tensión superficial, estabilidad de la espuma, y microviscosidad. [refs\(1757\)](#)

El indicador estándar de la MPF que ha sido aceptado es la medida de la RLE en el líquido amniótico. Sin embargo, como se creyó que este enfoque estaba asociado con una incidencia alta inaceptable de indicaciones falsas de madurez en algunas situaciones clínicas (como la diabetes), las medidas de FG fueron también agregadas para eliminar el alto grado de resultados de L/E elevados falsamente. La técnica usada más común para medir la RLE es la TLC (Tabla 40-3, método 1). [ref\(1758\)](#) Los fosfolípidos de interés en el líquido amniótico son purificados antes del análisis por TLC, generalmente por extracciones múltiples con solvente orgánico. La separación de los fosfolípidos es llevada a cabo más frecuentemente usando una fase estacionaria de sílica gel y una fase móvil constituida por cloroformo-metanol-agua o cloroformo- metanol-hidróxido de amonio. [ref\(1759\)](#) La separación de los fosfolípidos puede ser llevada a cabo en una o dos dimensiones. Una vez que los fosfolípidos de interés han sido separados, puede realizarse la visualización de las fracciones separadas seguida por la medida de la RLE. Se pueden visualizar los fosfolípidos separados rociando la placa de TLC con ácido sulfúrico o ácido fosfórico y luego calentando para carbonizar los fosfolípidos orgánicos, rociando los platos con rodamina B o diclorofluoresceína y visualizando las manchas fluorescentes bajo luz ultravioleta, o haciendo reaccionar los doble enlaces de los



ácidos grasos con acetato cúprico o ácido sulfúrico (con o sin dicromato) para producir un compuesto coloreado. La cuantificación de una mancha individual y el cálculo de la RLE puede llevarse a cabo por muchas técnicas; sin embargo, las más frecuentemente empleadas son la transmisión o reflexión densitométrica.

También se han desarrollado métodos enzimáticos para la determinación de lecitina y esfingomielina, aunque son raramente usados.[ref\(1760\)](#)

La determinación de RLE por TLC requiere un alto grado de habilidad y un trabajo intenso, la determinación insume aproximadamente entre 4 y 5 horas. La técnica también no es muy reproducible, especialmente entre laboratorios. Usando un valor de corte de RLE de 2.0 para indicar una MPF, se puede encontrar que los valores citados de sensibilidad y especificidad oscilan entre 70% y 90%.[ref\(1761\)](#) Como ya se mencionó antes, existen diferentes opiniones con respecto a la confiabilidad de la RLE en embarazadas complicadas por diabetes mellitus.[ref\(1762\)](#) Algunos estudios han fracasado en demostrar cualquier diferencia importante en la maduración pulmonar, o en la previsibilidad de la RLE, para fetos de madres diabéticas cuando los sujetos son equiparados en edad gestacional, sexo, o raza.[ref\(1763\)](#) Los estudios también sugieren que la interpretación clínica de las RLEs puede ser diferente entre diferentes grupos raciales.[ref\(1764\)](#) Las pacientes diabéticas a menudo tienen valores de RLE mayores que 2.0 aunque el síndrome de dificultad respiratoria se desarrolla en los recién nacidos.

Otros lípidos en lugar de la lecitina y esfingomielina han mostrado tener una importancia en el pronóstico de la evaluación de la MPF. Hallman y col.[ref\(1765\)](#) demostraron que cuando el FG representa un 3% o más del total de fosfolípidos los pulmones fetales estaban maduros. Debido a que el FG aumenta rápidamente en concentración desde el tiempo en que es detectable, la presencia de cualquier FG en una placa de TLC es generalmente indicativo de MPF. Puede desarrollarse la determinación de FG en concordancia con la medida de la relación L/E por TLC. Si solamente se determina la relación L/E, es generalmente adecuado una cromatografía uni-dimensional.

Sin embargo, si también se va a determinar FG, generalmente se indica una cromatografía bi-demensional para minimizar la presencia de sustancias interferentes. El fosfatidilglicerol puede ser determinado por otros métodos además de TLC. Probablemente los más comunes de estos procedimientos alternativos son los métodos de aglutinación del látex. Estos procedimientos tienen una adecuada sensibilidad analítica para detectar FG (0.5 µg/mL). La contaminación de la muestra con sangre o meconio no interfiere con el ensayo. Otras ventajas incluyen la habilidad de desarrollar la prueba en un período corto de tiempo y la falta de necesidad de un equipo especial. La gran desventaja es la subjetividad del ensayo, puesto que la presencia o ausencia de aglutinación se determina visualmente. También se han descrito métodos enzimáticos para las determinaciones de FG que pueden desarrollarse rápidamente (< 1 hora) y son efectivos y de costo mínimo.[ref\(1766\)](#) Aunque el glicerol endógeno puede dar resultados falsamente aumentados, la contaminación de la muestra con glicerol es improbable.

La principal desventaja de las determinaciones de FG para la evaluación de la MPF es la pobre especificidad clínica.

Uno de los indicadores biofísicos más comúnmente usados para la evaluación de la MPF es la prueba de estabilidad de la espuma, o ensayo de agitación (Tabla 40-3, método 2).[ref\(1767\)](#) En este procedimiento, se mezclan diluciones seriadas de líquido amniótico con volúmenes iguales de etanol 95%. Las muestras son luego agitadas y se inspeccionan las



burbujas alrededor del menisco. Si hay presente una cantidad adecuada de tensoactivo pulmonar, las burbujas formadas como resultado de la agitación persistirán. El porcentaje final de etanol usado en la prueba (47.5% luego de diluir con partes iguales de líquido amniótico) es óptimo para prevenir la formación de burbujas debido a la presencia de proteínas, ácidos biliares, o las sales de ácidos grasos en el líquido amniótico. Las desventajas de este método incluyen la falta de objetividad completa en decidir que significa “estabilidad” de espuma y el problema de determinar el grado de inmadurez si una muestra fracasa en dicho ensayo. [ref\(1768\)](#)

El FSI, una modificación de la prueba de agitación, fue desarrollado en respuesta a los problemas asociados con dicha prueba. [ref\(1769\)](#) En este procedimiento, se agrega líquido amniótico a una serie de tubos con cantidades variantes de etanol para que las concentraciones finales de etanol varíen desde 44% a 50%. Todos los tubos son luego agitados, y se inspecciona en cada tubo la presencia de un anillo estable completo de espuma. El FSI se define como el tubo con mayor volumen de etanol que tiene un anillo estable de burbujas en el menisco luego de la agitación. El agregado de un colorante azul a la solución permite una mejor visualización. Un FSI de 0.48 (48% de etanol) es comparable con una RLE de 2.0. [ref\(1770\)](#) Las interferencias en este método pueden resultar de un líquido amniótico contaminado con sangre, meconio, desechos encontrados en material vaginal, y neutrófilos no completamente removidos por centrifugación. El uso de tubos recolectores siliconizados puede causar resultados falso-positivos, aunque generalmente a contaminación con siliconas puede ser inferida por la presencia de cantidades igualmente grandes de espuma a cualquier concentración de etanol.

Otra medida biofísica para evaluar la función del tensoactivo pulmonar es el uso del procedimiento de polarización de fluorescencia (Tabla 40-3, método 3). [ref\(1771\)](#) En este procedimiento, una tintura fluorescente agregada a la muestra se reparte entre la albúmina y el tensoactivo presente en la muestra. Las moléculas de colorante asociadas a la albúmina están restringidas en rotación, lo cual resulta en un alto grado de polarización de la luz fluorescente emitida. Aquellas moléculas coloreadas que están asociadas con el tensoactivo están en un ambiente mucho menos polar, comparado con las unidas a la albúmina y tienen una mayor habilidad para rotar. Así, poca de la luz fluorescente emitida por el colorante asociado con el tensoactivo puede ser polarizada. La cantidad de luz fluorescente polarizada medida en una muestra de líquido amniótico refleja la distribución del colorante entre la proteína y el tensoactivo de la muestra de líquido amniótico, permitiendo calcular la relación entre tensoactivo y albúmina presente en la muestra.

Muestra.

El líquido amniótico recolectado por medio de amniocentesis o desde una muestra vaginal debe ser transportado al laboratorio sobre hielo y procesado tan rápido como se pueda. Si la muestra es una mezcla de fluido vaginal, se debe tener cuidado para asegurar que no hay contaminación de la muestra con orina materna. Las muestras a ser analizadas por polarización de fluorescencia no deben ser centrifugadas porque la centrifugación disminuye falsamente los resultados. [ref\(1772\)](#) Estas muestras son estables por más de 72 horas si se mantienen refrigeradas (entre 2° y 8° C) o congeladas a -10° C. Las muestras para otro tipo de análisis deben ser centrifugadas a $\leq 500g$ por 5 minutos. Las muestras centrifugadas pueden almacenarse a -20° C por períodos prolongados sin cambios significativos en la



relación L/E.

Intervalo de referencia.

Una RLE mayor de 2.0 es generalmente considerado indicativo de MPF. La presencia de FG es también considerada positiva para MPF. Para el procedimiento de polarización de fluorescencia, las muestras con concentraciones de tensoactivo/ albúmina de 55 miligramos de tensoactivo por gramo de albúmina (55 mg/g) y mayores son consideradas maduras, con valores menores o iguales de 39 mg/g son consideradas inmaduras. Los resultados entre 40 y 54 mg/g son considerados indeterminados.

Gonadotropina coriónica β -humana (β -GCH)

Steven C. Kazmierczak

Principios del análisis.

La GCH es una hormona glucoproteica de la familia de dipéptidos (subunidades α y β), las cuales tienen en común la subunidad α . Las subunidades β de cada hormona proteica determina la especificidad de esa hormona. Las otras hormonas glucoproteicas que comparten la misma subunidad α son LH, FSH, y TSH. Aunque estas tres hormonas son producidas en la hipófisis, la GCH es secretada por los trofoblastos.

En circulación, la GCH está predominantemente en forma de dímero inactivo (α - β). Solamente pequeñas cantidades están presentes como subunidades libres α o β . En la orina, una porción importante de GCH está presente como un fragmento metabólico comúnmente referido como el “núcleo - β ”. [ref\(1773\)](#) El fragmento núcleo- β consiste de dos cadenas polipeptídicas derivadas de la subunidad β de la GCH y unidas por puentes disulfuro. Este fragmento retiene el único determinante inmunológico encontrado en la GCH intacta y en la subunidad β . La orina de una mujer embarazada contiene grandes cantidades del núcleo- β , mientras que en el suero es esencialmente no cuantificable.

Las medidas de la GCH para la determinación de presencia o ausencia de embarazo son ampliamente usadas por el público en general y por los profesionales de la salud. Usando una prueba que tenga una sensibilidad de 25 mUI/mL, la orina puede revelar un resultado positivo dentro de los 3 a 4 días luego de la implantación del blastocito. El desarrollo de anticuerpos monoclonales específicos para la subunidad β de la GCH han eliminado esencialmente los problemas de reactividad cruzada con LH, FSH, y TSH. Las medidas de GCH en orina y suero son casi exclusivamente mediante el uso de inmunoensayos que utilizan marcadores no isotópicos o, en menor extensión radioisótopos como marcadores. Los marcadores no isotópicos de uso corriente incluyen enzimas y compuestos fluorescentes y quimioluminiscentes.

El primer ensayo usado para medir la GCH detectaba su actividad biológica y así medía solamente el heterodímero intacto. [ref\(1774\)](#) Los ensayos biológicos han sido totalmente reemplazados por inmunoensayos, los cuales pueden medir la molécula madre así como también las subunidades libres de los fragmentos de GCH. Los inmunoensayos para la detección de GCH en la orina y en el suero están disponibles como procedimientos cualitativos y cuantitativos. Las principales diferencias en estos procedimientos dependen del tipo de

marcador empleado y la especificidad del anticuerpo usado.

El inmunoensayo cualitativo original empleaba partículas (látex o glóbulos rojos de oveja) recubiertas con moléculas de GCH como el marcador (Tabla 40-4, método 1). Estos métodos son comúnmente conocidos como procedimientos de inhibición de la aglutinación (ver capítulo 11). Debido a su pobre sensibilidad, aproximadamente 200 a 500 mUI/mL, estos métodos no se usan más.[ref\(1775\)](#)

Los ensayos cualitativos nuevos (Tabla 40-4, método 2) para la GCH tienen límites de detección de aproximadamente 15 a 25 mUI/mL. Estas pruebas de concentración inmunoenzimáticas emplean anticuerpos policlonales de cabra o monoclonales de ratón dirigidos contra la subunidad α o β de la GCH como anticuerpo de captura. La detección de la subunidad β capturada puede desarrollarse usando una variedad de técnicas inmunológicas, incluyendo complejos coloidales monoclonales de ratón anti subunidad α de la GCH, una enzima unida al anticuerpo anti subunidad β , o enzima unida al anticuerpo monoclonal dirigido contra la molécula de GCH intacta.[ref\(1776\)](#) Estos procedimientos generalmente no reaccionan con el fragmento núcleo- β o la subunidad β libre de la GCH. Aunque estos ensayos son de naturaleza cualitativos, se ha demostrado que usando suero como muestra, una concentración de GCH puede ser obtenida (más de 100 mUI/mL) por medidas del tiempo (en segundos) desde el agregado de la muestra o de reactivo hasta la aparición d un resultado positivo.[ref\(1777\)](#)

Los métodos cuantitativos más frecuentemente usados para GCH en orina y suero incluyen procedimientos enzimáticos, quimioluminiscentes, y radioinmunoanálisis (RIA). El ensayo RIA (Tabla 40-4, método 3) utiliza un formato de unión competitivo por medio del cual la GCH en la muestra problema compite con GCH- ^{125}I marcado por los sitios de unión sobre el anticuerpo de GCH. El desarrollo de ensayos inmunoenzimométricos sensibles y rápidos (Tabla 40-4, método 4) para la GCH se han vuelto los métodos más populares. Una amplia variedad de ensayo de enzima inmunoanálisis se han desarrollado para las determinaciones de GCH. Se han descrito variaciones en el tipo de soporte de fase sólida, la fuente y especificidad del anticuerpo, y el método de desarrollo de la reacción indicadora. Los anticuerpos de captura y detección usados en un ensayo en particular pueden ser monoclonales, policlonales, o una combinación de los dos y pueden estar dirigidos hacia la subunidad α , β , o la molécula intacta de GCH. El anticuerpo de detección está generalmente conjugado con peroxidasa de rábano o fosfatasa alcalina. Los ensayos inmunométricos que emplean un marcador quimioluminiscente son también ampliamente usados. La sensibilidad para la GCH de todos estos ensayos es aproximadamente de 2 mUI/mL, la cual es similar a la alcanzada con el RIA. El rango de análisis de los inmunoensayos típicamente oscila entre 500 y 1000 mUI/mL, aunque algunos procedimientos tienen rangos de trabajo dinámicos de más de 50,000 mUI/mL.[ref\(1778\)](#)

La exactitud de la medida de la GCH depende de la calidad y pureza de la preparación de referencia usada para estandarizar el ensayo así como también del uso de estos estándares por los fabricantes de los sistemas reactivos para la medida de GCH. Preparaciones de referencia internacional (IRP) compuestas de GCH altamente purificada son provistas por la Organización Mundial de la Salud para estandarizar estos ensayos. Un estándar usado ampliamente es el primer IRP que aún contiene pequeñas cantidades de impurezas de subunidades. Al primer IRP le sucedió el Segundo Estándar Internacional (IS), el cual



consiste de una mezcla de GCH y subunidades. Una unidad del segundo IS es igual a aproximadamente 2 unidades del primer IRP. [ref\(1779\)](#)

El uso de GCH para estandarizar estos ensayos puede conducir a problemas importantes. Por ejemplo, un ensayo para GCH que es específico para la subunidad β libre y reacciona solo ligeramente con la GCH intacta podría mostrar una actividad muy pequeña con el primer estándar IRP. Por otra parte, un segundo ensayo que reaccione predominantemente con la GCH intacta y muestre una pequeña reactividad con la subunidad β libre podría exhibir alta actividad con el primer estándar IRP. Más importante es, sin embargo la diferencia en los resultados que se puede observar con muestras de pacientes medidas por dos métodos diferentes. Por ejemplo, una muestra de orina de una mujer embarazada, la cual contiene predominantemente núcleo- β , mostrará una concentración alta cuando se mida por el primer ensayo y una baja concentración cuando se mida por el segundo ensayo. Esto muestra como diferentes ensayos pueden dar resultados diferentes sobre la misma muestra clínica.

Muestra.

Se puede usar muestras de orina o suero. Si se usa orina, la muestra debe ser centrifugada para remover cualquier material particulado. *Las concentraciones de GCH en suero son muy similares a las encontradas en orina.* [ref\(1780\)](#) *La GCH urinaria no muestra ninguna variación uniforme en el organismo por un período de 24 horas.* [ref\(1781\)](#) Por lo tanto, no es necesario desarrollar las medidas de GCH usando la primer orina de la mañana.

Si se demora el análisis de GCH en orina, ésta debe ser congelada, no refrigerada. La GCH en orina es estable cuando se almacena congelada a -20°C , la GCH y su subunidad β libre son estables en el suero almacenado a 4°C por más de 6 días. Cuando se almacenan a -20°C , la GCH y la subunidad β son estables por lo menos por 6 meses. [ref\(1782\)](#) Las muestras para el análisis de la β -GCH son más lábiles debido al rompimiento y degradación de la cadena de péptidos de la subunidad β . El suero y la orina para el análisis de la GCH- β deben ser inmediatamente congelados si se demora el análisis. [ref\(1783\)](#)

Intervalo de referencia.

Mujeres no embarazadas normales, mujeres premenopáusicas y hombres sanos tienen concentraciones circulantes bajas de GCH de 0.2 a 0.80 mUI/mL.

Mujeres posmenopáusicas pueden mostrar valores mucho más altos que estos. [ref\(1784\)](#) Durante el embarazo, la concentración de GCH varía mucho con la edad gestacional (Tabla 40-5). Durante este tiempo, la GCH se dobla en concentración aproximadamente cada 2 días. [ref\(1785\)](#) Una menor velocidad de aumento puede indicar un alto riesgo de aborto.

Agradecimientos

Los editores desean agradecer a Paul T. Russell, quien es el autor de las versiones anteriores de los métodos de Bilirrubina en el líquido amniótico, y Evaluación de la madurez fetal: análisis en el líquido amniótico de la relación lecitina-esfingomielina y fosfatidil glicerol.

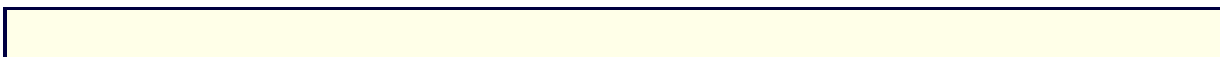
Referencias



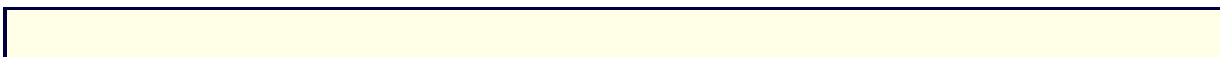
1. Abramovich DR: The volume of amniotic fluid and its regulating factors. In Fairweather DVI, Eskes TKAB, editors: *Amniotic fluid: research and clinical application*, ed 2, Amsterdam, 1978, Excerpta Medica.
2. Duenhoelter JH, Pritchard JA: Fetal respiration: quantitative measurements of amniotic fluid inspired near-term by human and rhesus fetuses, *Am J Obstet Gynecol* 125:306-309, 1976.
3. Seeds AE: Current concepts of amniotic fluid dynamics, *Am J Obstet Gynecol* 138:575-586, 1980.
4. Sandler M, editor: *Amniotic fluid and its clinical significance*, New York, 1981, Marcel Dekker.
5. Fairweather DVI, Eskes TKAB, editors: *Amniotic fluid: research and clinical applications*, Amsterdam, 1978, Excerpta Medica.
6. Hytten FE: Water transfer. In Chamberlain GVP, Wilkinson AW, editors: *Placental transfer*, Tunbridge Wells, 1979, Pitman Medica.
7. Weaver TE: Pulmonary surfactant-associated proteins, *Gen Pharmacol* 18:1-8, 1987.
8. Pierce JG, Parsons TF: Glycoprotein hormones: structure and function, *Annu Rev Biochem* 50:465-495, 1980.
9. Eberlein WR: The fetal adrenal cortex. In Christy NP, editor: *The human adrenal cortex*, New York, 1971, Harper & Row.
10. France JT, Seddon RJ, Liggins GC: A study of a pregnancy with low estrogen production due to placental sulfatase deficiency, *J Clin Endocrinol Metab* 36:1-9, 1973.
11. Schindler AE, Siiteri PK: Isolation and quantitation of steroids from normal human amniotic fluids, *J Clin Endocrinol Metab* 28:1189-1198, 1968.
12. Kundu N, Carmody PJ, Didolkar SM, Petersen LP: Sequential determination of serum human placental lactogen, estriol, and esterol for assessment of fetal morbidity, *Obstet Gynecol* 52:513-520, 1978.
13. Notation AD, Tagatz GE: Unconjugated estriol and 15a-hydroxyestriol in complicated pregnancies, *Am J Obstet Gynecol* 128:747-756, 1977.
14. Glinoe D, de Nayer P, Bourdoux P, et al.: Regulation of maternal thyroid during pregnancy, *J Clin Endocrinol Metab* 71:276-287, 1990.
15. Lowe TW, Cunningham FG: Pregnancy and thyroid disease, *Clin Obstet Gynecol* 34:72-80, 1991.
16. Kennedy RL, Darne J, Griffiths H, et al: Thyroid-stimulatory effects of human chorionic gonadotropin in early pregnancy, *Horm Res* 33:177-183, 1990.
17. Desai RK, Norman RJ, Jialal I, et al: Spectrum of thyroid function abnormalities in gestational trophoblastic neoplasia, *Clin Endocrinol (Oxf)* 29:583-592, 1988.
18. van Stiphout WAHJ, Hofman A, de Bruijn AM: Serum lipids in young women before, during, and after pregnancy, *Am J Epidemiol* 126:922-928, 1987.
19. Studd JW, Wood S: Serum and urinary proteins in pregnancy. In Wynn RM, editor: *Obstetrics and gynecology annual*, New York, 1976, Appleton-Century-Crofts.
20. Davison JM: The urinary system. In Hytten F, Chamberlain G, editors: *Clinical physiology in obstetrics*, Oxford, 1980, Blackwell Scientific Publications.
21. van Geuns HJ, van Kessel H: Creatinine in amniotic fluid and fetal renal function. In Fairweather DVI, Eskes TKAB, editors: *Amniotic fluid: research and clinical application*, ed 2, Amsterdam, 1978, Excerpta Medica.
22. Spillman T, Cotton DB: Current perspectives in the assessment of fetal pulmonary surfactant status with amniotic fluid, *CRC Rev Clin Lab Sci* 27:341-389, 1989.
23. Hallman M: Recycling surfactant: a review of human amniotic fluid as a source of surfactant for treatment of respiratory distress syndrome, *Rev Perinatal Med* 6:197-226, 1989.
24. Cochrane CG, Revak SD: Pulmonary surfactant protein B (SP-B): structure-function relationships, *Science* 254:566-568, 1991.
25. Martin RJ, Fanaroff AA, Skalina MEL: The respiratory system. In Fanaroff AA, Martin RJ, editors: *Behrman's neonatal/perinatal medicine*, St. Louis, 1983, Mosby.



26. Reynolds MS, Wallander KA: Use of surfactant in the prevention and treatment of neonatal respiratory distress syndrome, *Clin Pharmacol* 8:559-576, 1989.
27. Shapiro DL: The development of surfactant replacement therapy and the various types of replacement surfactants, *Semin Perinatol* 12:174-179, 1988.
28. Jobe A: Metabolism of endogenous surfactant and exogenous surfactants for replacement therapy, *Semin Perinatol* 12:231-244, 1988.
29. Kleihauer E: The hemoglobins. In Stave U, editor: *Perinatal physiology*, New York, 1978, Plenum Publishing.
30. Hecht F, Jones RT, Koler RD: Newborn infants with Hb Portland 1, an indicator of a-chain deficiency, *Ann Hum Genet* 31:215-218, 1967.
31. Avery ME, Mead J: Surface properties in relation to atelectasis and hyaline membrane disease, *Am J Dis Child* 97:517-523, 1959.
32. Robertson B: Corticosteroids and surfactant for prevention of neonatal RDS, *Ann Med* 25:285-288, 1993.
33. Liley AW: The administration of blood transfusions to the foetus in utero, *Triangle* 7:184-189, 1966.
34. Posner BI: Insulin metabolizing enzyme activities in human placental tissue, *Diabetes* 22:552-563, 1973.
35. Klopfer A: Placental metabolism. In Hytten F, Chamberlain G, editors: *Clinical physiology in obstetrics*, Oxford, 1980, Blackwell Scientific Publications.
36. Cunningham FG, Lindheimer MD: Hypertension in pregnancy, *N Engl J Med* 326:927-932, 1992.
37. Sundaram SG, Goldstein PJ, Manimekalai S, et al: Alpha-fetoprotein and screening markers of congenital disease, *Reprod Med* 12:481-492, 1992.
38. Merkatz IR, Nitowsky AM, Macri JN, et al: An association between low maternal serum alpha-fetoprotein and fetal chromosome abnormalities, *Am J Obstet Gynecol* 148:886-894, 1984.
39. Cheng EY, Luthy DA, Zebelman AM, et al: A prospective evaluation of a second trimester screening test for fetal Down syndrome using maternal serum alpha-fetoprotein, HCG, and unconjugated estriol, *Obstet Gynecol* 81:72-76, 1993.
40. Haddow JE, Palomaki GE, Knight GJ, et al: Prenatal screening for Down's syndrome with use of maternal serum markers, *N Engl J Med* 327:588-593, 1992.
41. Martinez F, Trounson, A: An analysis of factors associated with ectopic pregnancy in a human in vitro fertilization program, *Fertil Steril* 45:79-87, 1986.
42. Carson SA, Buster JE: Ectopic pregnancy, *N Engl J Med* 329:1174-1180, 1993.
43. Palomaki GE, Knight GJ, Haddow JE, et al: Prospective intervention trial of a screening protocol to identify fetal trisomy 18 using maternal serum alpha-fetoprotein, unconjugated oestriol, and human chorionic gonadotropin, *Prenatal Diagn* 12:925-930, 1992.
44. Mancini G, Peronam M, Dall'Amico CD, et al: HCG, AFP, and uE3 patterns in the 14-20th weeks of Down syndrome pregnancies, *Prenatal Diagn* 12:619-624, 1992.
45. Carl J, Christensen M, Mathiesen O: Human placental lactogen (HPL) model for the normal pregnancy, *Placenta* 12:289-298, 1991.
46. Little B, Billar RB: Endocrine disorders. In Romney SL, Gray MJ, Little AB, et al, editors: *Gynecology and obstetrics: the health care of women*, New York, 1975, McGraw-Hill.
47. Gluck L, Kulovich MV: Lecithin/sphingomyelin ratios in amniotic fluid in normal and abnormal pregnancies, *Am J Obstet Gynecol* 115:539-546, 1973.
48. Kulovich MV, Hallman MB, Gluck L: The lung profile I: Normal pregnancy, *Am J Obstet Gynecol* 135:57-63, 1979.
49. Kulovich MV, Gluck L: The lung profile II: Complicated pregnancy, *Am J Obstet Gynecol* 135:64-70, 1979.
50. Bent AE, Gray JH, Luther ER, et al: Assessment of fetal lung maturity: relationship of gestational age and pregnancy complications to phosphatidylglycerol levels, *Am J Obstet Gynecol* 139:664-669, 1981.
51. Spillman T, Cotton DB, Lynn SC Jr, Bretauiere JP: Removal of a component interfering with phosphatidylglycerol estimation in the "Helena" system for amniotic fluid phospholipids, *Clin Chem*,



- 30:737-740, 1984.
52. Dubin SB: The laboratory assessment of fetal lung maturity, *Am J Clin Pathol* 97:836-848, 1992.
 53. Clements JA, Platzker ACG, Tierney DF, et al: Assessment of the risk of respiratory distress syndrome by a rapid test for surfactant in amniotic fluid, *N Engl J Med* 286:1077-1081, 1972.
 54. Sher G, Statland BE, Freer DE, et al: Assessing fetal lung maturation by the foam stability index assay, *Obstet Gynecol* 52:673-677, 1978.
 55. Shinitzky M, Goldfisher A, Bruck A: A new method for assessment of fetal lung maturity, *Br J Obstet Gynecol* 83:833-844, 1976.
 56. Russell JC: A calibrated fluorescence polarization assay for assessment of fetal lung maturity, *Clin Chem* 33:1177-1184, 1987.
 57. Herbert WNP, Chapman JF, Schnoor MM: Role of the TDx FLM assay in fetal lung maturity, *Am J Obstet Gynecol* 168:808-812, 1993.
 58. Duck-Chong, CG: Lamellar body phospholipid content of amniotic fluid: a possible index of fetal lung maturity, *Am J Obstet Gynecol* 136:191-196, 1979.
 59. Dubin S: Determination of lamellar body size, number density and concentration by differential light scattering from amniotic fluid: physical significance of A650, *Clin Chem* 34:938-943, 1988.
 60. Dubin S: Characterization of amniotic fluid lamellar bodies by resistive-pulse counting: relationship to measures of fetal lung maturity, *Clin Chem* 35:612-616, 1989.
 61. Garite TJ, Freeman RK, Nageotte MP: Fetal maturity cascade: a rapid and cost effective method for fetal maturity testing, *Obstet Gynecol* 67:619-622, 1986.
 62. Herbert WNP, Chapman JF: Clinical and economic considerations associated with testing for fetal lung maturity, *Am J Obstet Gynecol* 155:820-823, 1986.
 63. Liley AW: Amniocentesis and amniography in hemolytic disease. In Greenhill JP, editor: *Yearbook of obstetrics and gynecology*, 1964-1965 series, St. Louis, 1964, Mosby.
 64. Pennoyer MM, Hartman AF Sr: Management of infants born of diabetic mothers, *Postgrad Med* 18:199-206, 1955.
 65. Benzie RJ, Doran TA, Harkins JL, et al: Composition of the amniotic fluid and maternal serum in pregnancy, *Am J Obstet Gynecol* 119:798-810, 1982.
 66. Bevis DCA: Blood pigments in haemolytic disease of the newborn, *J Obstet Gynaecol Br Emp* 63:68-75;1956.
 67. Liley AW: Liquor amnii analysis in the management of the pregnancy complicated by rhesus sensitization, *Am J Obstet Gynecol* 82:1359-1370;1961.
 68. Greene MF, Fenci M deM, Tulchinsky D: Biochemical aspects of pregnancy. In Tietz N, editor: *Textbook of clinical chemistry*, Philadelphia, Penn., 1986, Saunders.
 69. van Kessel H: Spectrophotometry of amniotic fluid. In Sandler M, editor: *Amniotic fluid and its clinical significance*, New York, 1981, Marcel Dekker.
 70. Brazie JV, Bowes WA, Ibbott FA: An improved, rapid procedure for the determination of amniotic fluid bilirubin and its use in the prediction of the course of Rh-sensitized pregnancies, *Am J Obstet Gynecol* 104:80-86, 1969.
 71. Mallikarjuneswara VR, Clemetson CAB, Carr JJ. Determination of bilirubin in amniotic fluid, *Clin Chem* 16:180-184, 1970.
 72. Hochberg CJ, Witheiler AP, Cook H: Accurate amniotic fluid bilirubin analysis from the bloody tap, *Am J Obstet Gynecol* 126:531-534, 1976.
 73. Queenan JT: Amniotic fluid analysis, *Clin Obstet Gynecol* 14:505-536, 1971.
 74. Freer DE, Statland BE: Measurement of amniotic fluid surfactant, *Clin Chem* 27:1629-1641, 1981.
 75. Tsao FH, Zachman RD: Prenatal assessment of fetal lung maturations: a critical review of amniotic fluid phospholipid tests. In Farrell PM, editor: *Lung development: biological and clinical perspectives*, vol 2, Neonatal respiratory distress, New York, 1982, Academic Press.
 76. Chapman JF, Herbert WNP: Current methods for evaluating fetal lung maturity, *Lab Med* 17:597-602,



- 1986.
77. Clark HW, Jacobson W: Detection of pulmonary surfactant in human amniotic fluid by polarized light microscopy, *J Physiol* 418:139P, 1989.
 78. Clements PA, Platzker ACG, Tierney DF, et al: Assessment of the risk of respiratory distress by a rapid test for surfactant in the amniotic fluid, *N Engl J Med* 286:1077, 1972.
 79. Gluck L, Kulovich MV, Borer RC Jr, et al: Phosphatidylinositol and phosphatidylglycerol in amniocentesis, *Am J Obstet Gynecol* 109:440, 1971.
 80. Dubin SB: Assessment of fetal lung maturity by laboratory methods, *Clin Lab Med* 12(3):603-620, 1992.
 81. Richardson DK, Torday JS: Racial differences in predictive value of the lecithin/sphingomyelin ratio, *Am J Obstet Gynecol* 170:1273-1278, 1994.
 82. Hallman M, Kulovich M, Kirkpatrick E, et al: Phosphatidylinositol and phosphatidylglycerol in amniotic fluid: indices in lung maturity, *Am J Obstet Gynecol* 125:613, 1976.
 83. Chapman JF, Phillips JC, Rosenthal MA, Herbert WNP: Evaluation of the PG-numeric assay for semi-automated analysis for phosphatidylglycerol in amniotic fluid, *Clin Chem* 36:1974-1977, 1990.
 84. Bradley CA, Salhany KE, Entman SS, et al: Automated enzymatic measurement of lecithin, sphingomyelin, and phosphatidylglycerol in amniotic fluid, *Clin Chem* 33:81, 1987.
 85. Clements JA, Platzker ACG, Tierney DF: Assessment of risk of respiratory distress syndrome by a rapid test for surfactant in amniotic fluid, *N Engl J Med* 286:1077-1081, 1972.
 86. Stratland BE, Freer DE: Evaluation of two assays of functional surfactant in amniotic fluid, surface tension lowering ability, and the foam stability index test, *Clin Chem* 25:1770-1773, 1979.
 87. Sher G, Statland BE, Freer DE: Clinical evaluation of the quantitative foam stability index test, *Obstet Gynecol* 55:617-620, 1980.
 88. Tait JF, Franklin RW, Simpson JB, et al: Improved fluorescence polarization assay for use in evaluating fetal lung maturity. I. Development of the assay procedure, *Clin Chem* 32:248, 1986.
 89. Russell J, Cooper C, et al: Multicenter evaluation of TDx test for assessing fetal lung maturity, *Clin Chem* 15:1005-1010, 1989.
 90. Wehmann RE, Blithe DL, Flack MR, Nisula BC: Metabolic clearance rate and urinary clearance of purified beta-core, *J Clin Endocrinol Metab* 69:510-517, 1989.
 91. Jeng LL, Moore RM, Kaczmarek RG: How frequently are home pregnancy tests used? Results from the 1988 National Maternal and Infant Health Survey, *Birth* 18:11-13, 1991.
 92. Chard T: Pregnancy tests: a review, *Hum Reprod* 7:701-710, 1992.
 93. Ascheim S, Zondek B: Die Schwangerschaftsdiagnose aus dem Harn durch 94. Nachweis des Hypophysenvorderlappen-hormone II. Praktische und theoretische Ergebnisse aus den Harnuntersuchungen, *Klin Wochenschr* 7:1453-1457, 1928.
 94. Mishalani SH, Seliktar J, Braunstein GD: Four rapid serum-urine combination assays of choriogonadotropin (hCG) compared and assessed for their utility in quantitative determinations of hCG, *Clin Chem* 40:1944-1949, 1994.
 95. Vankrieken L, De Hertogh R: Rapid, automated quantification of total human chorionic gonadotropin in serum by a chemiluminescent enzyme immunometric assay, *Clin Chem* 41:36-40, 1995.
 96. Ooi DS, Perkins SL, Claman P, Muggah HF: Serum human chorionic gonadotrophin levels in early pregnancy, *Clin Chem Acta* 181:281-292, 1989.
 97. Lenton EA, Hooper M, King H, et al: Normal and abnormal implantation in spontaneous in-vivo and in-vitro human pregnancies, *J Reprod Fertil* 92:555-565, 1991.
 98. Kent A, Kitau MJ, Chard T: Absence of diurnal variation in urinary chorionic gonadotrophin excretion at 8-13 weeks gestation, *Br J Obstet Gynecol* 69:1180-1181, 1991.
 99. Rao CV, Hussa RO, Carmen FR, et al: Stability of human chorionic gonadotropin and its α subunit in human blood, *Am J Obstet Gynecol* 146:65-68, 1983.
 100. Cole LA, Kardana A: Discordant results in human chorionic gonadotropin assays, *Clin Chem* 38:263-270, 1992.



101. Lee CL, Hes R, Shephert JH, et al: The purification and development of a radioimmunoassay for beta-core fragment of human chorionic gonadotrophin in urine: applications as a marker of gynecological cancer in premenopausal women, *J Endocrinol* 130:481-489, 1991.
102. Schwarz S, Berger P, Wick G: Epitope-selective monoclonal antibody based immunoradiometric assay of predictable specificity for differential measurement of choriogonadotropin and its subunits, *Clin Chem* 31:1322-1328, 1985.

Tablas

Tabla 40-1. Volumen de líquido amniótico en el embarazo normal.

Semanas de gestación	Volumen de líquido (mL)
12	5 - 200
14	50 - 200
16	150 - 300
18	200 - 400
20	225 - 775
22	300 - 500
24	500 - 675
26	500 - 700
28	500 - 875
30	400 - 1300
32	400 - 1375
34	500 - 1350
36	525 - 1500
38	300 - 1525
40	325 - 1450
42	600

Tabla 40-2. Métodos para el análisis de bilirrubina en el líquido amniótico.

Método:	Espectrofotometría
Tipo de análisis:	Absorbancia diferencial
Principio:	La bilirrubina absorbe a 450 nm; la absorción de fondo es corregida por extrapolación
Usos:	Común
Comentarios:	Exacto excepto en casos de hemólisis
Método:	Espectrofotometría previa extracción
Tipo de análisis:	Absorbancia diferencial
Principio:	La bilirrubina es extraída con cloroformo; la absorbancia es medida a 450 nm como en el método 1



Usos:	Menos común
Comentarios:	Reduce los efectos de interferencias

Tabla 40-3. Métodos para la evaluación de la madurez pulmonar fetal.

Método:	Cromatografía de capa fina
Principio:	La separación cromatográfica de los fosfolípidos usando un soporte sólido de silica gel es seguida por la visualización de los fosfolípidos por carbonización o formación de color usando varios pulverizadores químicos
Comentario:	Semicuantitativo Determinación de la RLE y FG No es un tipo de procedimiento estándar
Uso:	Frecuente
Método:	Estabilidad de la espuma (prueba de agitación e índice de estabilidad de espuma [IEE])
Principio:	Se mide la presencia de un tensoactivo adecuado en la muestra por su habilidad de mantener burbujas luego de la agitación de una mezcla líquido amniótico-etanol
Comentario:	Cualitativo Común como procedimiento estándar
Uso:	Frecuente
Método:	Polarización de fluorescencia
Principio:	La relación de tensoactivo y albúmina es determinada por el uso de un colorante fluorescente que tiene diferentes niveles de polarización de fluorescencia si se asocia con el tensoactivo o con la albúmina
Comentario:	Cuantitativo Común como procedimiento estándar
Uso:	Frecuente

Tabla 40-4. Métodos de análisis de GCH.

Método:	Inhibición de la aglutinación (prueba o prueba tubo)
Principio:	Las partículas de látex o glóbulos rojos de ovejas recubiertas con GCH mezcladas con la muestra reaccionan con los anticuerpos GCH provocando inhibición de la aglutinación de las partículas. Si la GCH no está en la muestra, los anticuerpos GCH entrecruzan las partículas o células provocando la



Uso:	aglutinación. Infrecuente
Comentarios:	No muy sensible Límite de detección de de 200-500 mUI/mL Método cuantitativo
Método:	Ensayo de concentración inmunoenzimático
Principio:	Ensayo tipo sandwich. La GCH en la muestra capturada por los primeros anticuerpos se une a la fase sólida. Se agrega de un anticuerpo detector dando un sandwich. El anticuerpo detector está unido covalentemente a una enzima marcadora o a una sustancia cromogénica.
Uso:	Frecuente
Comentarios:	Cualitativo y semicuantitativo Sensibilidad aproximadamente 25 mUI/mL
Método:	Radioinmunoanálisis (RIA)
Principio:	Ensayo basado en la inhibición competitiva. La GCH en la muestra compite con la GCH marcada con ¹²⁵ I por la unión con el anti-GCH.
Uso:	Frecuente aunque disminuye en popularidad
Comentarios:	Muy sensible
Método:	Inmunoenzimométrico (ELISA)
Principio:	Ensayo tipo sandwich. La GCH en la muestra capturada por los anticuerpos GCH se une a la fase sólida. Un anticuerpo detector anti-GCH marcado con enzima se une a la GCH de la muestra capturada formando un sandwich. Se agrega el sustrato de enzima. La cantidad de actividad enzimática encontrada es directamente proporcional a la concentración de GCH en la muestra.
Uso:	Apropiado para análisis estándar
Comentarios:	Frecuente

Tabla 40-5. Niveles de GCH de acuerdo a la edad gestacional.

Edad gestacional	GCH sérica (mUI/mL)
0 – 2 semanas	5 – 50
1 – 2 semanas	50 - 500
2 – 3 semanas	100- 5000
3 – 4 semanas	500 – 10,000
4 – 5 semanas	1,000 – 50,000
5 – 6 semanas	10,000 – 100,000
6 – 8 semanas	15,000 – 200,000

2 – 3 meses	10,000 – 100,000

Figuras

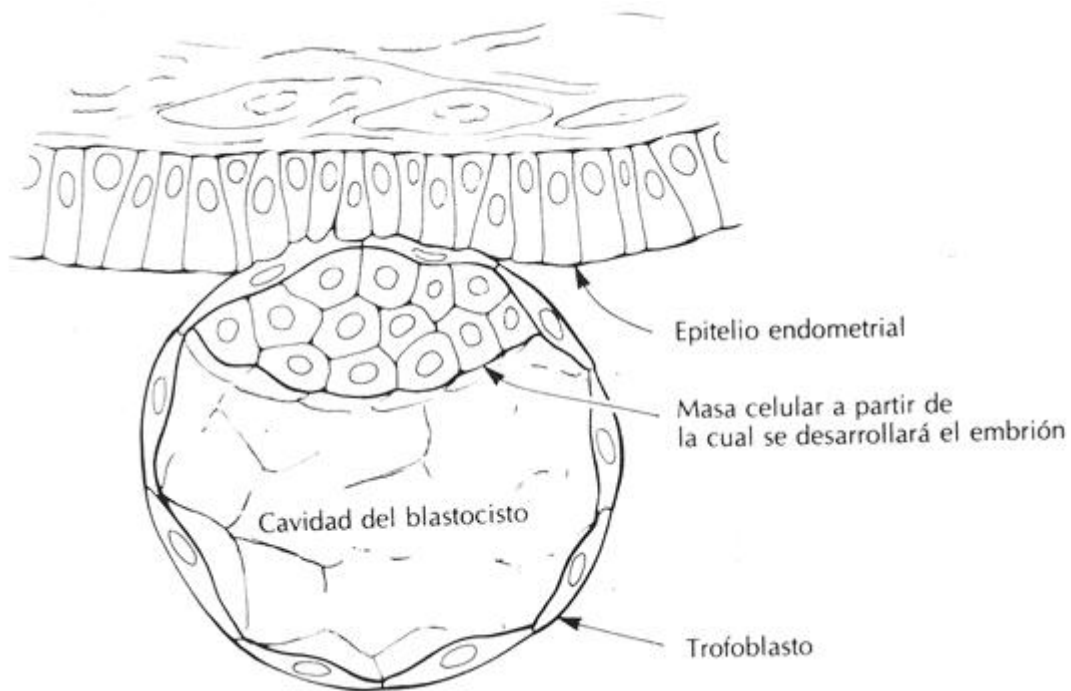


Figura 40-1 Fijación del blastocito a la pared endometrial.

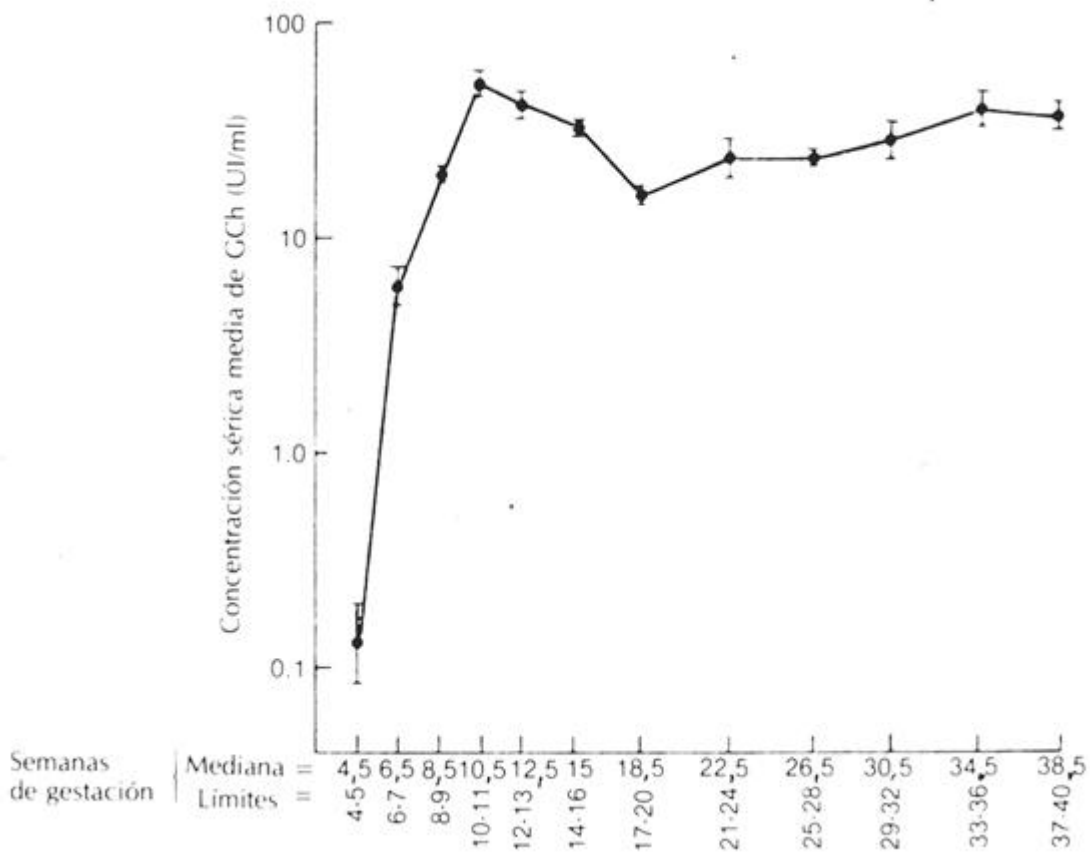


Figura 40-2 Concentraciones de gonadotrofina coriónica (HCG) séricas durante el embarazo. (De Goldstein DP, Aon T, Taymor MT, y col: *Am J Obstet Gynecol* 102:110-114, 1968.)

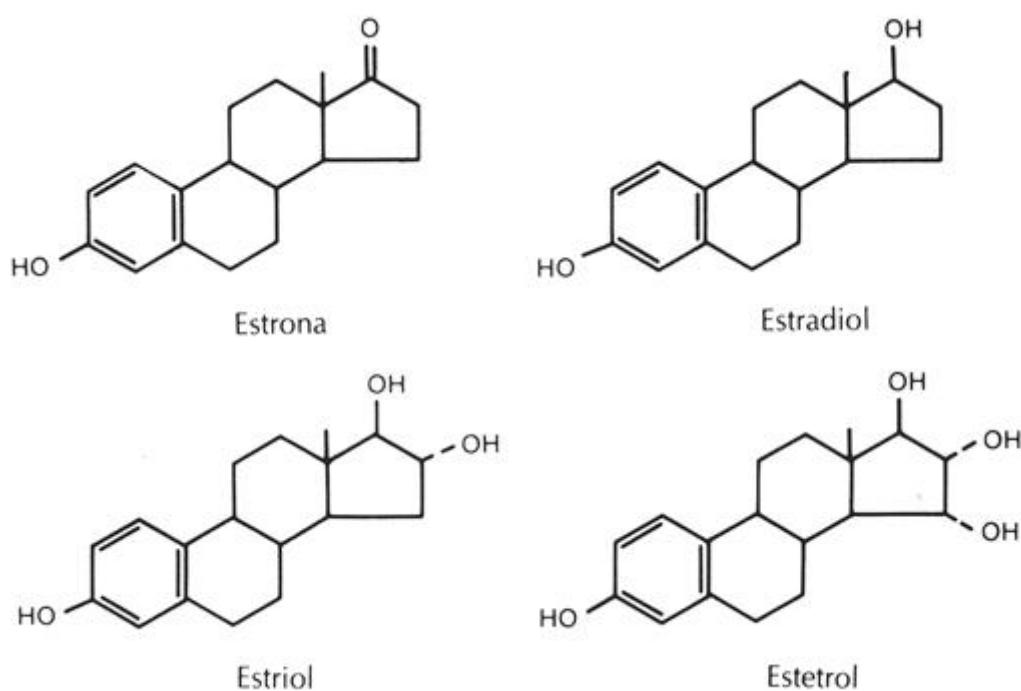


Figura 40-3 Estructuras de los estrógenos. Líneas punteadas, α -estereoconfiguraciones; líneas enteras, β -estereoconfiguraciones de los grupos hidroxílicos.

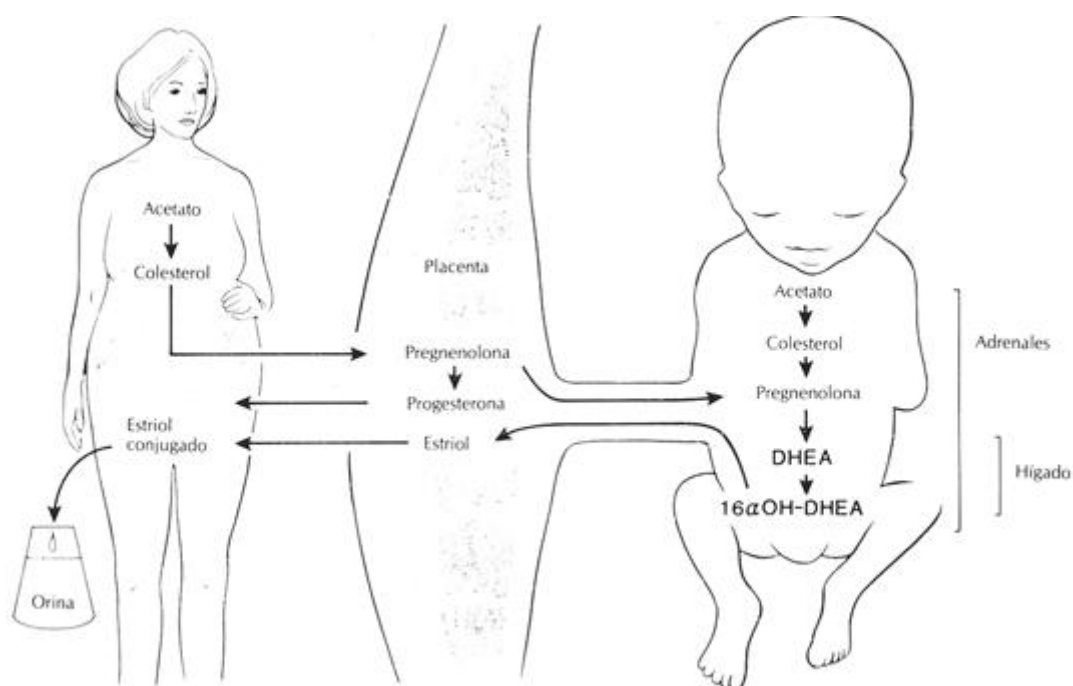


Figura 40-4 Esquema de la unidad fetoplacentaria. DHEA, Dehidroepiandrosterona; 16 α -OH-DHEA, 16alfa- hidroxidehidroepiandrosterona.

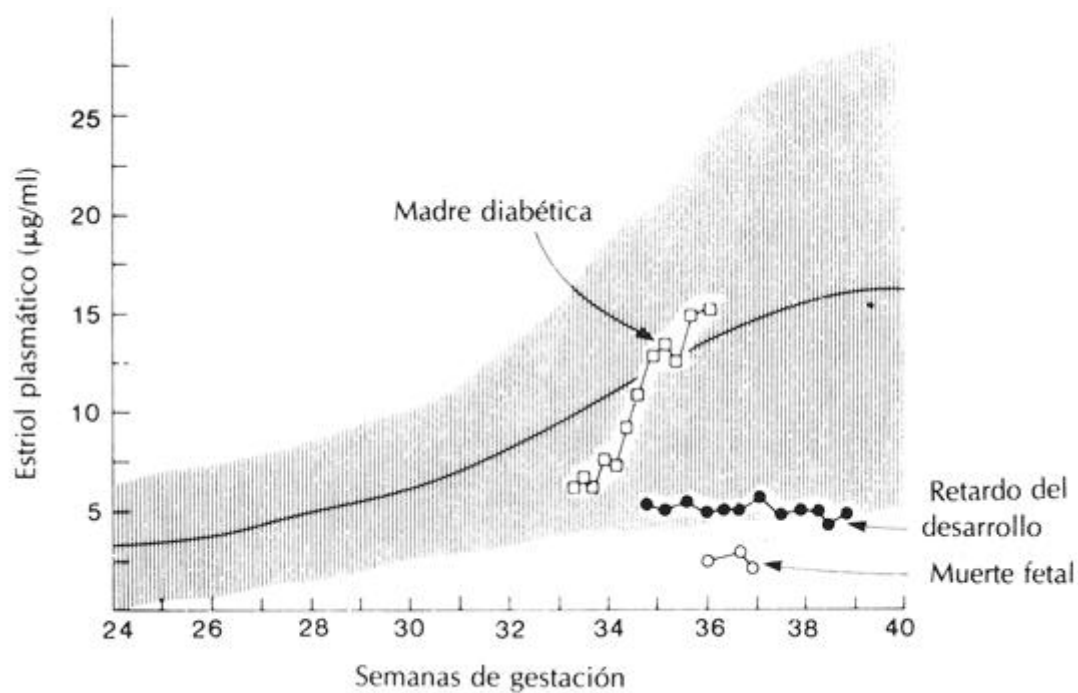


Figura 40-5 Percentiles promedio estimados (línea entera), 5° y 95° (área sombreada) para el estriol plasmático no conjugado durante el embarazo normal. Se ilustran los patrones de estriol en tres situaciones reales de embarazo.

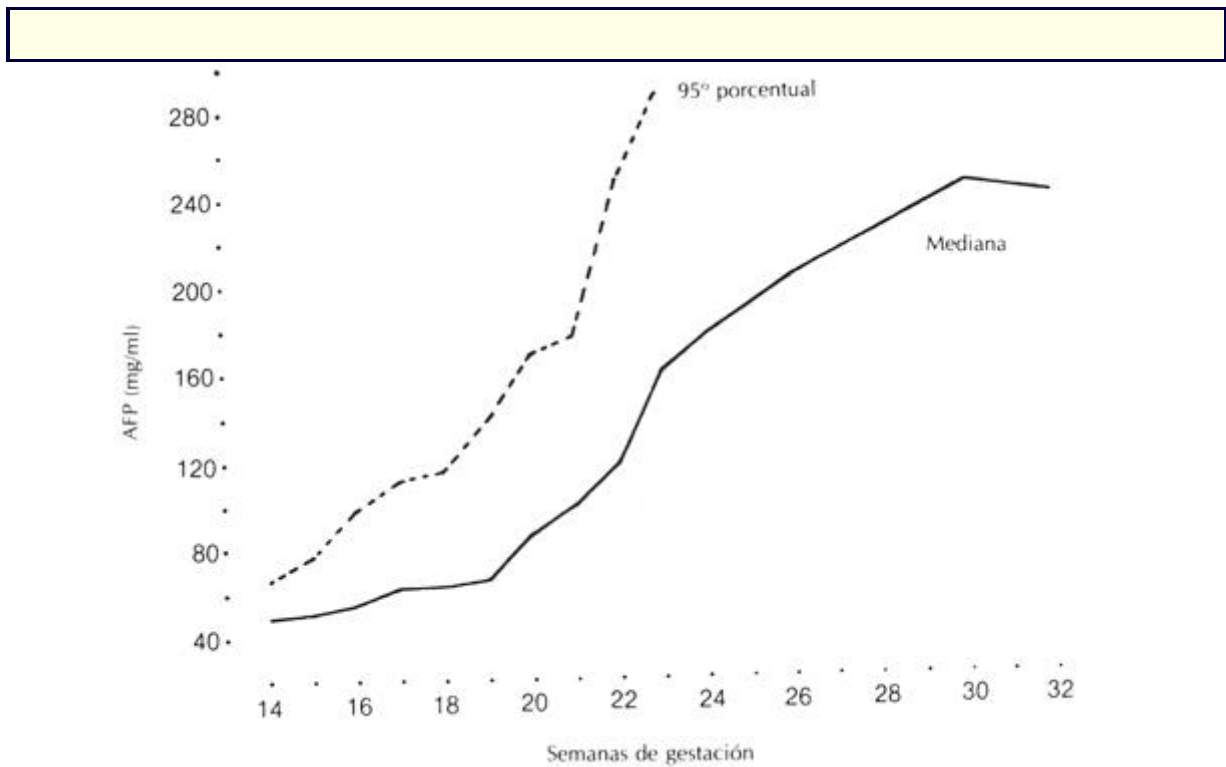


Figura 40-6 Mediana y percentil 95° de alfafetoproteína, AFP, en el suero materno. (De Crandall BF: In Kirkpatrick AM, Nakamura RM, editors: *Alpha-fetoprotein: laboratory procedures and clinical applications*, Nueva York, 1981, Masson.)

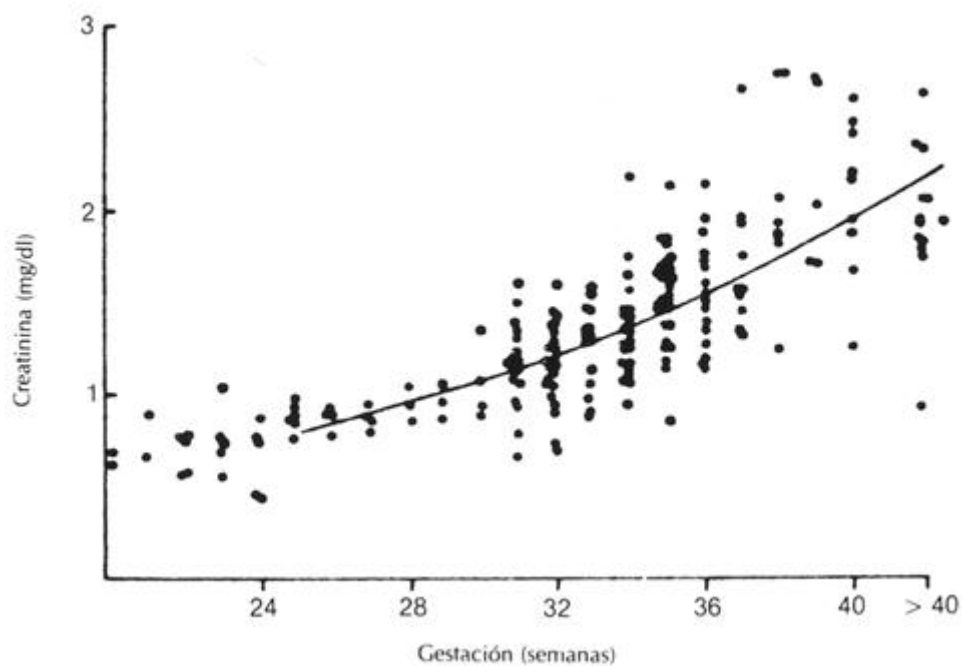


Figura 40-7 Distribución y curva de regresión de la concentración de creatinina en el líquido amniótico en miligramos por decilitro. (De Lind T: In Fairweather DVI, Eskes TKAB, editors: *Amniotic fluid: research and clinical application*, 2ª ed., Amsterdam, 1978, Excerpta Medica.)

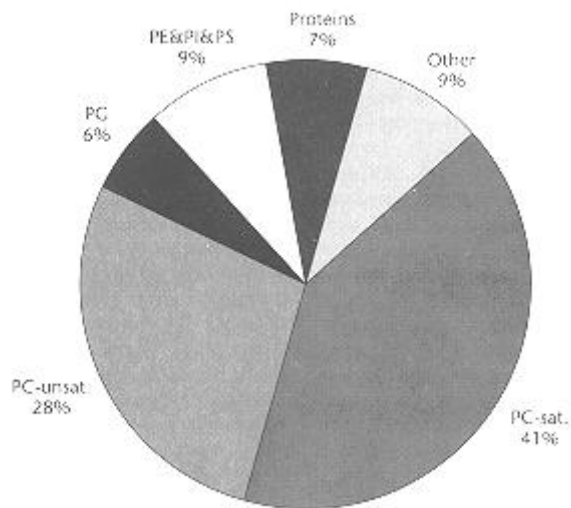


Figura 40-8 Composición del tensoactivo humano (por porcentaje en peso). *PC-sat.*, Fosfatidilcolina saturada; *PC-unsat.*, fosfatidilcolina no saturada; *PE*, fosfatidiletanolamina; *PG*, fosfatidilglicerol; *PI*, fosfatidilinositol; *PS*, fosfatidilserina. Incluye 3.8% de proteínas SP-A (SP-B y SP-C detectadas pero no cuantificadas). (De Hallman M: *Rev Perinatal Med* 6:197-226, 1989.)

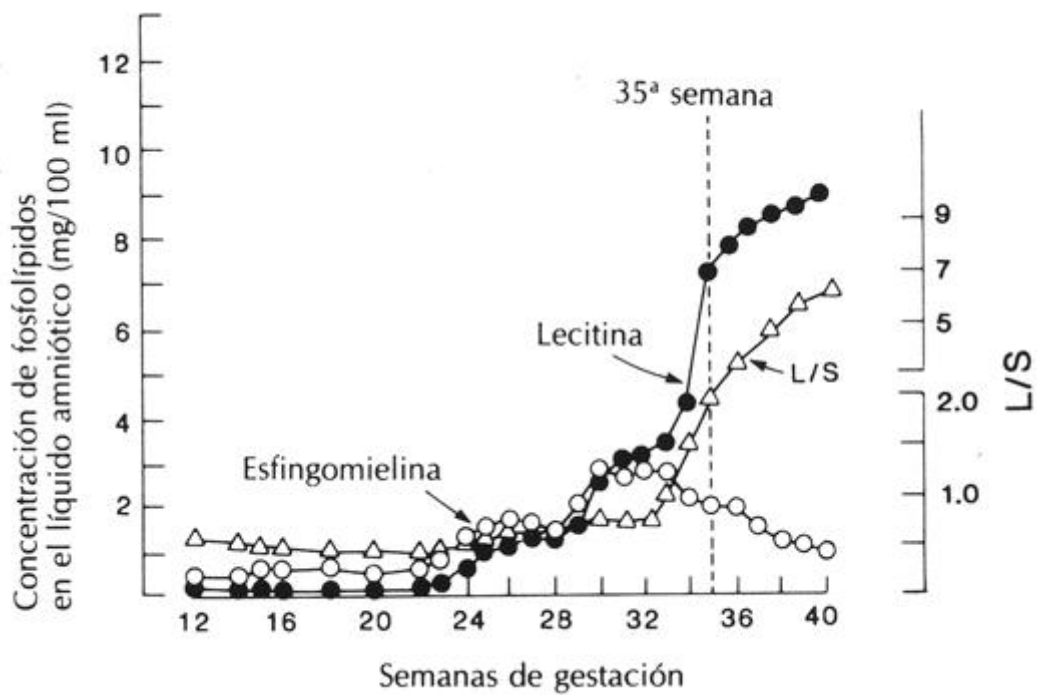


Figura 40-9 Lecitina, esfingomielina y relación lecitina/esfingomielina en el líquido amniótico durante un embarazo normal. (Adaptado de Gluck L, Kulovich MV: *Am J Obstet Gynecol* 115:539-546, 1973.)

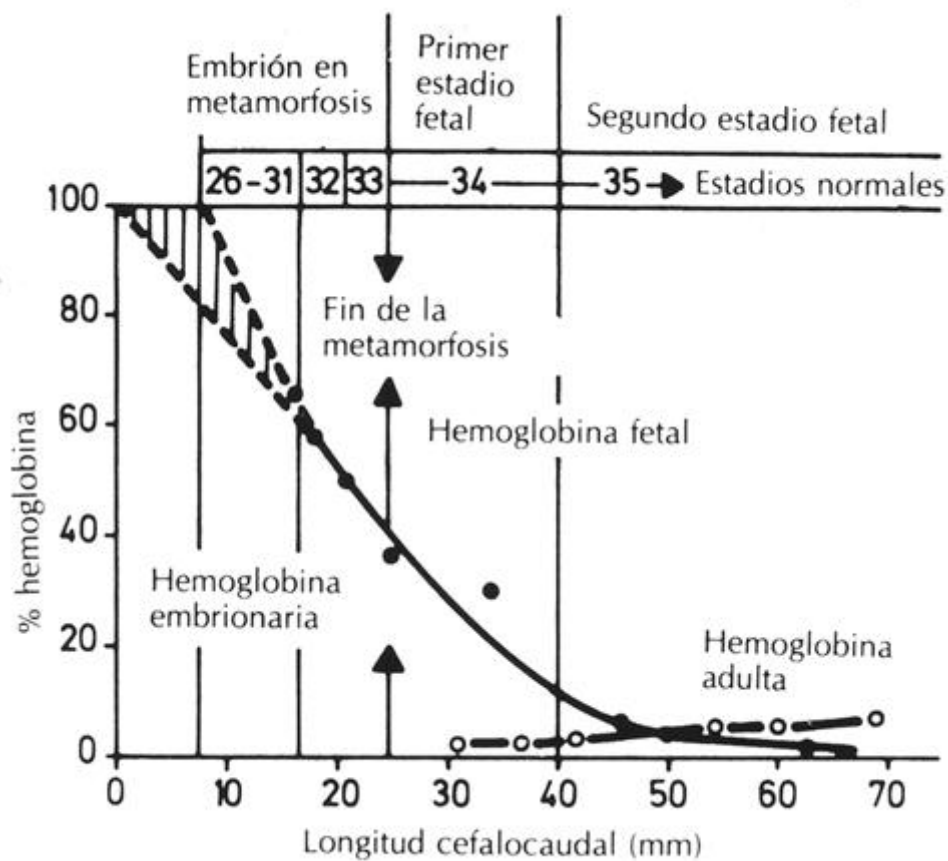


Figura 40-10 Relación entre los diferentes tipos de hemoglobina y los estadios del desarrollo ontogénico humano. *Líneas punteadas y área rayada, desarrollo esperado.* (De Kleihauer E: In Stave U, editor: *Perinatal physiology*, Nueva York, 1978, Plenum Publishing Corp.)

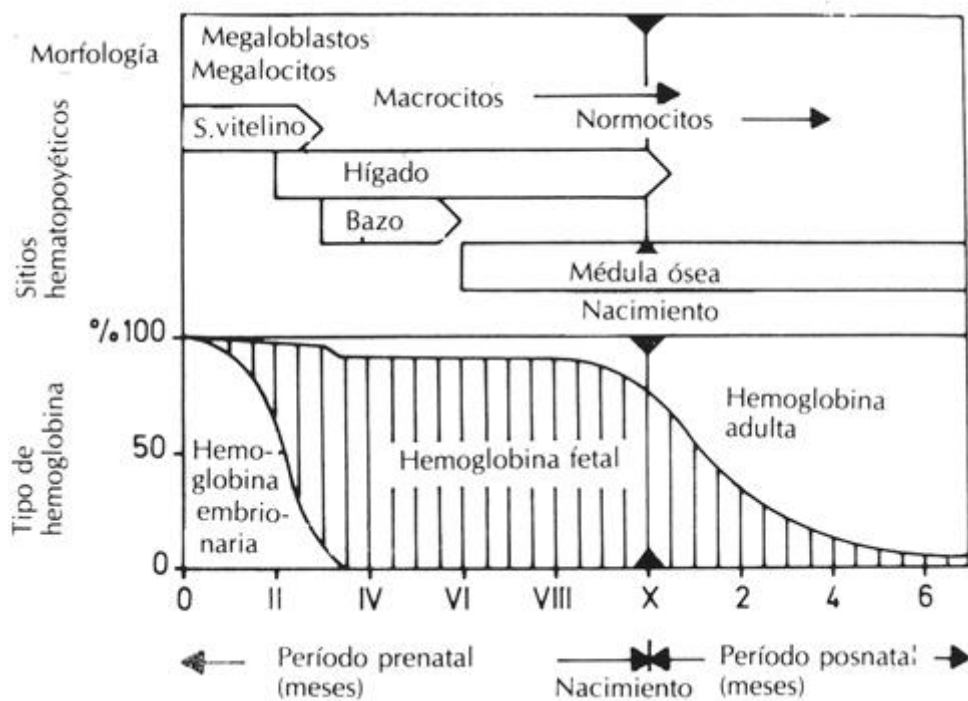


Figura 40-11 Alteraciones evolutivas al nivel de los sitios hematopoyéticos, morfología de los glóbulos rojos, y tipos de hemoglobina. (De Kleihauer E: In Stave U, editor: *Perinatal physiology*, Nueva York, 1978, Plenum Publishing Corp.)

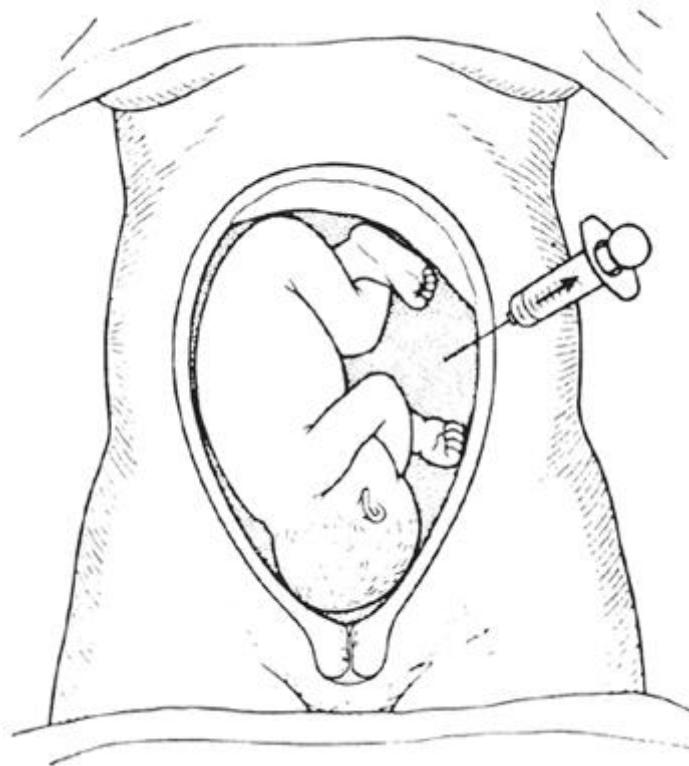


Figura 40-12 Diagrama que ilustra la amniocentesis. (De Queenan JT: *Clin Obstet Gynecol* 9:491-507, 1966.)

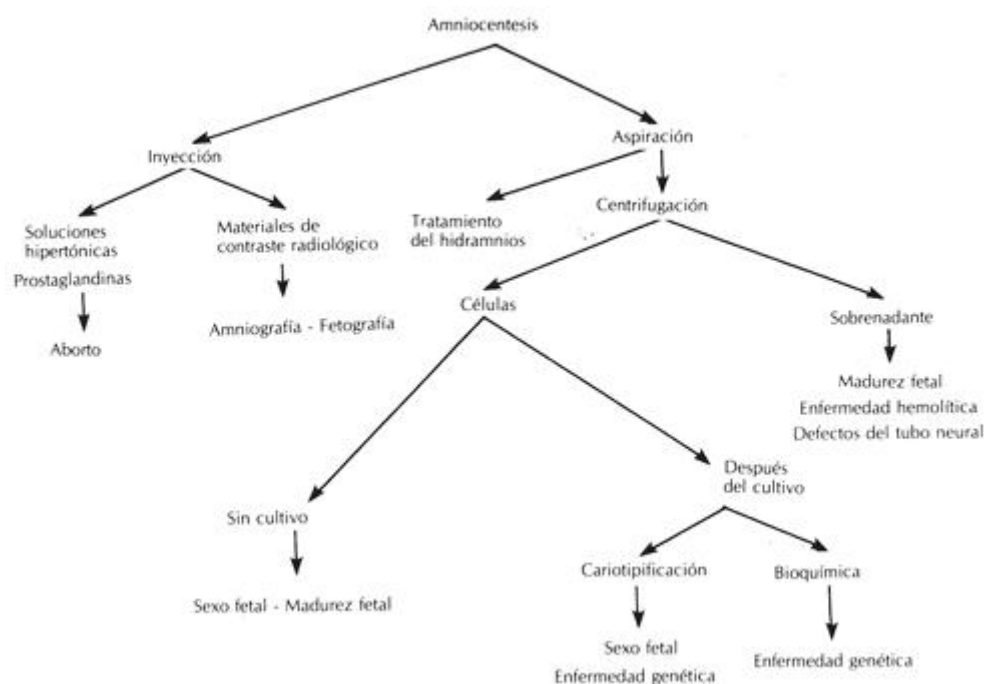


Figura 40-13 Aplicaciones clínicas de la amniocentesis. (De Pritchard JA, MacDonald PC: In Pritchard JA, MacDonald PC, editors: *Williams obstetrics*, 16ª ed., Nueva York, 1990, Appleton-Century-Crofts.)

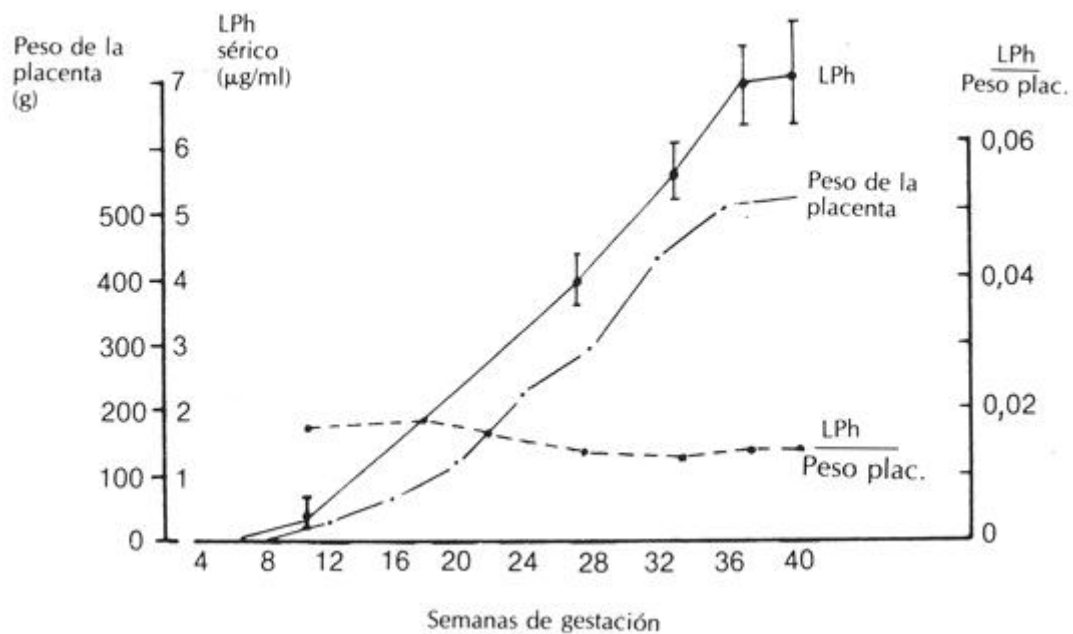


Figura 40-14 Concentraciones de lactógeno placentario humano, LPH, durante el embarazo normal. (De Selenkow HA, Saxena SM, Dana CL, Emerson K Jr.: In Pecile A, Fenzi P, editors; *The foeto-placental unit*, Amsterdam, 1969, Excerpta Medica.)

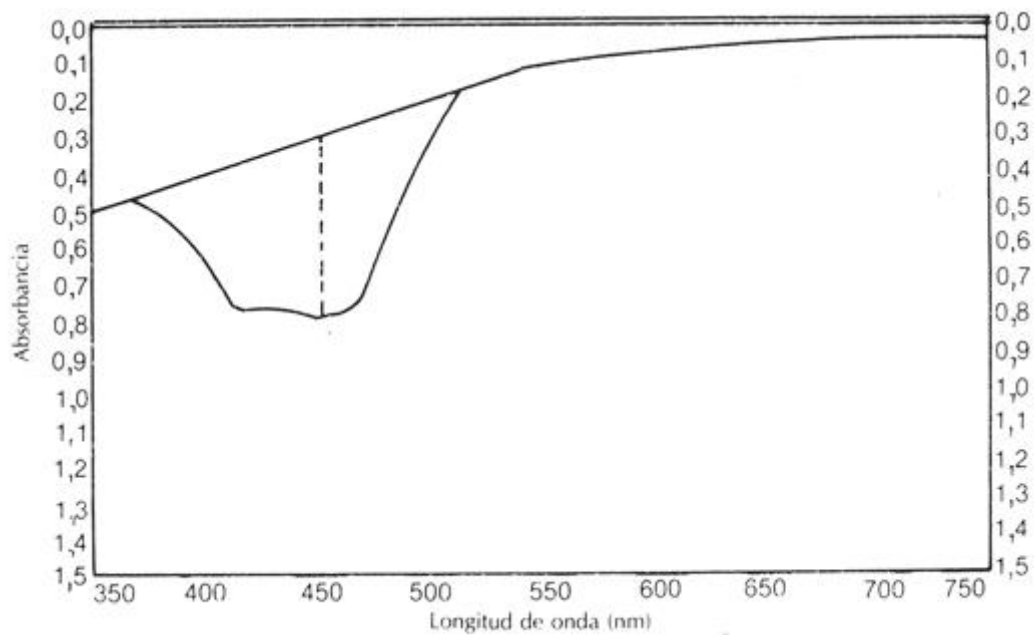


Figura 40-15 Espectro de la bilirrubina. Línea punteada, absorbancia a 450 nm. (De Queenan JT: *Clin Obstet Gynecol* 14:505-536, 1971.)

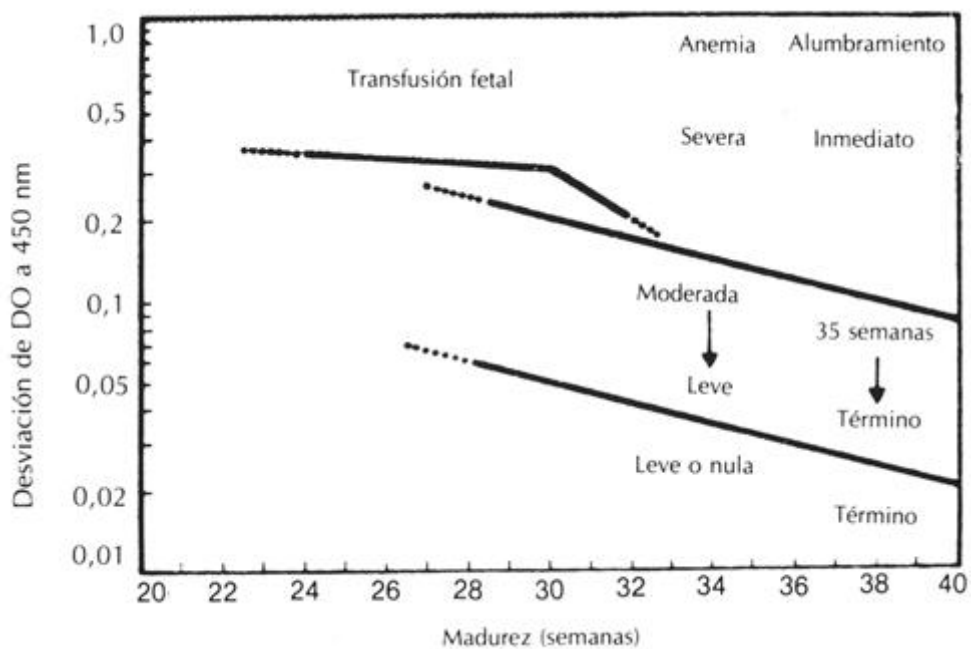


Figura 40-16 Relación entre la absorbancia a 450 nm, edad gestacional del líquido amniótico asociada con anemia fetal y tratamiento clínico sugerido. OD, densidad óptica (absorbancia). (De Liley AW: *Am J Obstet Gynecol* 86:485-494, 1963.)



CAPÍTULO 41

41. Líquidos Biológicos Extravasculares

Lewis Glasser

Líquidos Serosos

Formación

Alteraciones bioquímicas en la enfermedad

Líquido Sinovial

Líquido Sinovial Normal

Alteraciones bioquímicas en la enfermedad

OBJETIVOS

- Definir el concepto de líquidos serosos y describir su formación.
- Diferenciar trasudados de exudados en base a su origen, mecanismo de formación, y nivel de proteínas y enzimas.
- Enumerar los componentes de los líquidos serosos que pueden ser marcadores de enfermedad.
- Definir el concepto de líquido sinovial y describirlo en condiciones fisiológicas.
- Describir los cambios del líquido sinovial en condiciones patológicas.

Términos clave

ácido hialurónico Polímero de alto peso molecular formado por unidades del disácarido N-acetilglucosamina y ácido glucorónico.

artritis Inflamación de una articulación.

artritis psoriásica Enfermedad articular crónica y destructiva que ocurre en algunos pacientes con psoriasis cutánea.

artritis reumatoide Enfermedad inflamatoria crónica progresiva de origen desconocido que involucra múltiples articulaciones.

ascitis Acumulación patológica de Líquido seroso en la cavidad peritoneal.

derrame Acumulación patológica de líquidos en una cavidad corporal.

derrame parapneumónico Acumulación de líquido en el espacio pleural, secundario a una neumonía.

empiema Presencia de pus en una cavidad corporal como la cavidad pleural.

epicardio Capa visceral del pericardio.

exudado Líquido con alta concentración de proteínas que se acumula en una cavidad cuando aumenta la permeabilidad capilar.

gota Artritis inflamatoria secundaria a la cristalización de la sal monosódica del ácido úrico en la articulación.



hemotórax Presencia de sangre en la cavidad pleural secundaria a la ruptura local de vasos sanguíneos.

líquido seroso Líquido con características del suero.

líquido sinovial Líquido articular.

lupus eritematoso sistémico Enfermedad multisistémica causada por una reacción autoinmune que afecta piel, riñones, articulaciones y membranas serosas.

membrana parietal Aquella que recubre la pared de la cavidad.

membrana visceral Aquella que recubre externamente un órgano.

neuroartropatía Enfermedad articular secundaria a una enfermedad del sistema nervioso.

osteoartritis Forma degenerativa de artritis que se desarrolla a partir de una enfermedad ósea con afección articular.

osteocondromatosis Enfermedad articular caracterizada por el desarrollo de nódulos cartilaginosos en el tejido sinovial.

paracentesis Aspiración de líquido de una cavidad corporal.

pericardio Membrana que envuelve el corazón.

peritoneo Membrana serosa que encierra la cavidad abdominal y los órganos de la cavidad abdominal.

permeable Membrana que permite el paso de líquidos.

pleura Membrana serosa que recubre la superficie interior del tórax y el diafragma, así como la superficie externa de los pulmones.

presión osmótica coloidal del plasma Diferencia de presión osmótica entre el plasma y el líquido intersticial que porta el agua de la circulación sanguínea al espacio intersticial.

presión hidrostática Presión lateral del agua en el interior de una vaso que la hace fluir de los capilares hacia el espacio intersticial.

presión osmótica Fuerza con la que un solvente atraviesa una membrana semipermeable.

pseudogota Artritis inflamatoria secundaria a la formación de cristales de pirofosfato de calcio en la articulación.

quilo Líquido linfático rico en lípidos, de apariencia lechosa, originado del conducto linfático intestinal.

síndrome de Reiter Síndrome de origen desconocido caracterizado por inflamación de las articulaciones, la uretra y la conjuntiva.

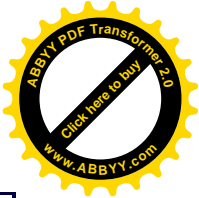
sinovitis dendrítica pigmentada Enfermedad articular de origen desconocido caracterizada por crecimiento proliferativo del tejido sinovial acompañada de depósitos de hemosiderina.

toracocentesis Aspiración de líquido de la cavidad pleural.

trasudado Líquido con baja concentración de proteínas que se acumula en una cavidad corporal.

Líquidos Serosos

En este capítulo, el término *líquido seroso* se referirá a los líquidos pleural, pericárdico o peritoneal. La palabra "seroso" deriva de *suero* y se usa para expresar el origen plasmático de los líquidos orgánicos. Los líquidos serosos se designan mediante diversos términos médicos. El *líquido pleural* (líquido torácico) se obtiene mediante la punción quirúrgica de la



pared torácica (*toracocentesis*). El término *empiema* indica la presencia de pus en la cavidad pleural. El líquido peritoneal se denomina frecuentemente mediante el término no anatómico de *líquido ascítico*. La palabra *ascitis* deriva de la palabra griega *askos* que significa "bolsa" y describe la condición del abdomen distendido en el paciente con una acumulación masiva de líquido peritoneal. *Paracentesis* indica la aspiración de líquido desde una cavidad y *líquido de paracentesis abdominal* es sinónimo de *líquido peritoneal*. La presencia de sangre total en las cavidades orgánicas se designa mediante el prefijo *hemo*, como en *hemotórax*. *Derrame quiloso* es la acumulación de linfa (quilo) en las cavidades orgánicas.

Formación

Formación normal.

Cada cavidad del cuerpo está recubierto por una delgada membrana serosa. El revestimiento externo constituye la membrana parietal y aquel que está en contacto con los órganos representa la membrana visceral. Las dos membranas, que juntas constituyen la membrana serosa, son continuas, mientras que el espacio situado entre ellas forma la cavidad corporal (Fig. 41-1). La membrana serosa se compone de una delgada capa de tejido conectivo que contiene numerosos capilares y vasos linfáticos, y de una capa superficial de células mesoteliales.

El líquido seroso es un ultrafiltrado del plasma, proveniente de la rica red capilar de la membrana serosa. Su formación es similar a la del líquido intersticial extravascular en cualquier otra parte del organismo. Existen tres factores importantes para su formación: la presión hidrostática, la presión coloidosmótica, y la permeabilidad capilar. La presión hidrostática impulsa la salida del líquido de los capilares hacia el interior de las cavidades orgánicas. Las proteínas plasmáticas impermeables contrarrestan la presión hidrostática y originan la absorción de líquido en los capilares. Esta fuerza se denomina *presión coloidosmótica* (PCO) y es proporcional a la concentración molar de las proteínas plasmáticas. Los linfáticos también desempeñan un papel importante en la absorción de agua, proteínas, y material particulado del espacio extravascular. En la cavidad torácica, el líquido se forma a nivel de la pleura parietal debido a que la elevada presión hidrostática de la circulación sistémica excede la presión coloidosmótica, y el líquido es reabsorbido por la pleura visceral, en donde la presión coloidosmótica de los capilares excede la baja presión hidrostática de la circulación pulmonar (Fig. 41-2). Normalmente existen menos de 15 mL de líquido en cada cavidad pleural, de 10 a 50 mL en la cavidad pericárdica, y menos de 50 mL en la cavidad peritoneal.[ref\(1786\)](#)

Formación anormal.

Los derrames se producen cuando los mecanismos fisiológicos normales responsables de la formación o absorción del líquido seroso se alteran. Por consiguiente, se observará una acumulación de líquido si se incrementa la permeabilidad capilar, si la presión hidrostática aumenta, si la presión coloidosmótica disminuye, o cuando se produce una obstrucción del drenaje linfático. La presión hidrostática aumenta en la insuficiencia cardíaca congestiva, lo cual es una causa frecuente de derrame. La hipoproteinemia determina una disminución de la presión coloidosmótica. La reducción de las proteínas del plasma puede ser secundaria a una disminución de la síntesis o a una pérdida proteica acentuada. La albúmina sintetizada en el

hígado representa la proteína más importante en el mantenimiento de la presión coloidosmótica. Las enfermedades hepáticas pueden alterar la síntesis de albúmina; la más frecuentemente asociada con hipoproteinemia y derrame es la cirrosis. La hipoalbuminemia también puede ser consecuencia de una pérdida aumentada de proteínas, como ocurre en el síndrome nefrótico. La permeabilidad capilar aumenta en la inflamación de las superficies pleurales. El incremento de la permeabilidad capilar puede también producir una pérdida de proteínas desde el espacio vascular, de modo que se ven favorecidas las fuerzas físicas que determinan una formación excesiva de líquido. Las condiciones que provocan un incremento de la permeabilidad capilar incluyen las enfermedades inflamatorias, infecciones y tumores metastásicos. Si existe una obstrucción de los vasos linfáticos se produce una acumulación de líquido rico en proteínas. Las neoplasias de los nódulos linfáticos frecuentemente provocan derrames pleurales. Las causas de derrames y la patología subyacente se mencionan en la Tabla 41-1.

Alteraciones bioquímicas en la enfermedad

Trasudados y exudados.

Los derrames serosos se denominan trasudados o exudados dependiendo de su contenido proteico. Esta diferenciación es importante dado que los trasudados no son de origen inflamatorio sino debidos a alteraciones de la presión hidrostática o coloidosmótica, mientras que los exudados son causados por un incremento de la permeabilidad capilar, secundario a enfermedades que directamente implican la inflamación de las superficies de las cavidades orgánicas. La diferenciación entre trasudados y exudados se basa en niveles arbitrarios de decisión clínica que han sido determinados empíricamente. Cuanto mayor es el contenido proteico del líquido, mayor será la probabilidad de que el derrame se deba a procesos que modifican la permeabilidad capilar e involucra las superficies de la cavidad corporal. La determinación de la densidad del líquido permite obtener una medida indirecta de la concentración de proteínas. Los líquidos pleurales se clasifican como exudados si la densidad es mayor de 1.015 g/mL o si el contenido proteico total es de 30 g/L o mayor. Es preferible una determinación de las proteínas totales a la determinación de la densidad. La diferenciación entre trasudados y exudados en los derrames pleurales será aún más precisa si las proteínas del líquido se comparan con las proteínas séricas totales. Dividiendo la concentración de proteína en el derrame entre la concentración de proteína en el suero, un valor de 0.5 o mayor indica la presencia de un exudado.[ref\(1787\)](#) Esta diferenciación puede ser aún más exacta si se emplea una proteína de peso molecular elevado como la lactato deshidrogenasa (LD), como un indicador de la permeabilidad capilar. Un valor de 0.6 o mayor para la relación entre la LD del derrame y la LD sérica es diagnóstico de la presencia de un exudado.[ref\(1788\)](#) Las diferencias entre trasudado y exudado en los derrames pleurales se resume en la Tabla 41-2. En el líquido peritoneal se emplean valores límite distintos. Un nivel de proteína total superior a 25 g/L permite clasificar al líquido peritoneal como un exudado.[ref\(1789\)](#) El uso de la diferencia entre la concentración de albúmina sérica y albúmina del líquido peritoneal permite una mejor diferenciación entre ascitis trasudativas y exudativas, en comparación con el uso de los niveles las proteínas totales; de este modo las diferencias menores de 11 g/L se relacionan con derrames de origen maligno.[refs\(1790\)](#)

Glucosa.

Las concentraciones de glucosa en el líquido pleural son similares a los niveles plasmáticos en el líquido normal y en los trasudados. La glucosa está disminuida en procesos exudativos como infecciones bacterianas, tuberculosis, neoplasias y enfermedad reumatoide.[ref\(1791\)](#) Una concentración de glucosa en el líquido pleural inferior a los 60 mg/dL o una diferencia entre glucosa plasmática y glucosa del derrame mayor de 30 mg/dL es clínicamente significativa. Solamente los niveles reducidos de glucosa poseen valor diagnóstico, y las diversas enfermedades asociadas con niveles disminuidos también están asociadas con niveles normales. Cualquier diagnóstico etiológico en base al hallazgo aislado de un nivel de glucosa reducido no es confiable. Existen dos mecanismos relacionados con la producción de valores reducidos de glucosa. Uno de estos mecanismos consiste en el incremento de la utilización de glucosa, y el segundo es el bloqueo relativo del transporte de glucosa desde la sangre hacia el líquido. Este último mecanismo se produce en los derrames reumatoides.[ref\(1792\)](#) La interpretación de la reducción del nivel de glucosa en los derrames pericárdicos y peritoneales es similar a la del derrame pleural.

pH.

La determinación del pH del líquido pleural es un elemento clínicamente útil en el tratamiento de pacientes con derrames paraneumónicos. Los pacientes con neumonía desarrollan derrames como consecuencia de la extensión del proceso infeccioso hacia la pleura visceral, con exudación de líquido en el espacio pleural. Las complicaciones de los derrames paraneumónicos incluyen la loculación y la formación de pus en la cavidad pleural. Los derrames se dividen en potencialmente benignos y derrames complicados, en base a su pH. Aquellos con un pH >7.3 disipan espontáneamente, mientras que un pH <7.2 indica la necesidad del drenaje del derrame.[ref\(1793\)](#) Es importante tener en cuenta que la muestra debe recogerse en condiciones anaerobias en una jeringa heparinizada, conservada en hielo y analizada a 37°C. Existe una relación significativa entre el pH del derrame pleural y la concentración de glucosa

Lípidos.

El quilo es una emulsión blanca lechosa de líquido linfático rico en grasas, originado en los conductos linfáticos intestinales. La acumulación de quilo en el espacio pleural es rara. Aún menos frecuente es la acumulación de quilo en las cavidades peritoneal o pericárdica. El líquido quiloso se acumula como consecuencia de la ruptura del conducto torácico. La presencia de quilomicrones en el análisis de las lipoproteínas representa el mejor indicio de la existencia de un derrame quiloso. Un nivel de triglicéridos superior a 1100 mg/litro es altamente sugestivo de un derrame quiloso.[ref\(1794\)](#) Los valores de colesterol no permiten diferenciar entre derrames quilosos y derrames no quilosos.

Marcadores de órganos.

Existen compuestos que pueden servir como marcadores un órgano específico involucrado en la patogénesis del derrame. El fundamento de estas determinaciones es fácil de comprender si se considera la localización anatómica de la víscera y su bioquímica normal (Fig. 41-3). Los agentes que han sido empleados como marcadores incluyen amilasa, pH, fosfatasa alcalina, urea y creatinina. La mayoría de los casos de ruptura esofágica se

acompañan de derrame pleural. La perforación esofágica origina la contaminación del derrame con secreciones de la cavidad oral y del estómago. La amilasa en el líquido pleural puede estar elevada y sus niveles pueden ser superiores a los de la amilasa sérica. Los estudios electroforéticos indican que esta amilasa proviene de la saliva.[ref\(1795\)](#) Otro elemento indicador de perforación esofágica es el pH del derrame. El jugo gástrico normal posee un pH inferior a 3.5. La filtración del contenido gástrico a través de la lesión esofágica se refleja en una acidificación del líquido pleural.[ref\(1796\)](#) Por ello, un pH inferior a 6 es clínicamente significativo. La determinación del pH en este caso, puede ser realizada al lado de la cama del paciente mediante el empleo de tiras de papel pH.

La amilasa representa un marcador aceptado de enfermedad pancreática. En la pancreatitis aguda, los tejidos peripancreáticos son infiltrados por un líquido rico en amilasa y se produce una peritonitis química, con formación de pequeñas cantidades de líquido peritoneal en la mayoría de los casos. Un estudio ha registrado niveles de amilasa en el líquido peritoneal equivalentes a $27,800 \pm 7560$ U/L.[ref\(1797\)](#) Los niveles de amilasa en el derrame son más elevados y persisten más tiempo que los correspondientes niveles de amilasa sanguínea.[ref\(1798\)](#) La ascitis pancreática es la acumulación crónica de cantidades masivas de líquido en asociación con una pancreatitis. No se sabe con certeza si este líquido refleja la filtración de secreciones pancreáticas debido a la destrucción de conductos o si representa una exudación de líquido a nivel de las superficies serosas, secundariamente a la irritación química.[ref\(1799\)](#) En la ascitis pancreática, la amilasa en el líquido peritoneal alcanza un valor que oscila entre 680 y 129,500 U/L.[ref\(1800\)](#) Los derrames pleurales se observan en un 15% de los casos de pancreatitis. El incremento de los niveles de amilasa se debe a drenaje linfático transdiafragmático o a la filtración de la enzima a través del diafragma.[ref\(1801\)](#) En casos raros, el líquido pleural está presente debido a la existencia de una comunicación directa entre la pleura y la cavidad peritoneal.[ref\(1802\)](#)

La fosfatasa alcalina ha demostrado ser un marcador de los procesos patológicos que afectan al intestino delgado. El origen de la enzima puede ser la filtración de líquido rico en fosfatasa alcalina desde el contenido intestinal o su extravasación a través de la pared intestinal.[ref\(1803\)](#) Esta enzima está elevada en los derrames serosos peritoneales asociados con perforaciones intestinales e infartos del intestino delgado y en la sangre peritoneal de pacientes con traumatismos del intestino delgado.[ref\(1804\)](#) Los valores registrados son superiores a los correspondientes en sangre periférica.

Tanto la urea como la creatinina son indicadores útiles en el diagnóstico diferencial de ruptura de la vejiga urinaria después de traumatismo abdominal. La orina extravasada presentará niveles elevados de urea y creatinina. La primera difunde libremente y provocará también una elevación de la urea en la sangre; por el contrario, la creatinina es relativamente impermeable al peritoneo y sus niveles sanguíneos no aumentarán. En los derrames serosos no complicados, los niveles de urea y de creatinina son reducidos. Si el médico aspira por error, orina desde la vejiga, tanto la urea como la creatinina se encontrarán elevadas en esta muestra, pero sus concentraciones sanguíneas estarán dentro del intervalo de referencia.

Líquido Sinovial

Las articulaciones son las uniones entre los huesos. Las articulaciones diartroidales móviles están compuestas por un cartílago articular hialino y una cápsula fibrosa revestida por una membrana en su superficie interna (Fig. 41-4). El líquido sinovial ocupa la cavidad articular y actúa como lubricante, manteniendo a un mínimo la fricción entre los huesos durante el movimiento o durante la sustentación del peso corporal. Este líquido también aporta la única nutrición destinada al cartílago a través de un proceso de difusión, acompañado de un efecto similar al de una esponja cuando es comprimida y relajada. El término *synovia* fue acuñado por Paracelso y deriva del griego *syn* ("con"), del latín *ovum* ("huevo"), y el sufijo *-ia* (que indica condición), el cual se refiere a la similitud del líquido con la clara del huevo.

El líquido sinovial es un dializado del plasma mezclado con ácido hialurónico. Está formado por la ultrafiltración a nivel de la rica red vascular del tejido sinovial, mientras que el ácido hialurónico, una mucoproteína, es sintetizado y excretado al dializado por células sinoviales.

Líquido sinovial normal

El volumen líquido en la articulación normal depende del tamaño de la estructura. La articulación de la rodilla usualmente contiene de 0.1 a 3.5 mL de líquido.^{[ref\(1805\)](#)} Raramente se obtiene líquido sinovial normal. Éste es claro o amarillo pálido, con una densidad cercana a la del plasma pero con una elevada viscosidad en relación con el agua debido al complejo de proteína-polisacárido del ácido hialurónico, el cual representa el 99% de las mucoproteínas presentes en el líquido. El ácido hialurónico es un polímero de alto peso molecular compuesto de una larga cadena de unidades repetidas de N-acetilglucosamina y ácido glucorónico. Esta molécula es hidrolizada en los estados inflamatorios por la enzima hialuronidasa presente en los neutrófilos. Cuando esto ocurre, la viscosidad del líquido disminuye en forma significativa, lo que permite al médico evaluar directamente la presencia de líquido inflamatorio.

La concentración proteica del líquido sinovial está relacionada con el peso molecular de las proteínas debido al efecto de diálisis en la membrana sinovial. Así, la albúmina se encuentra presente en una mayor concentración en relación a las globulinas de mayor peso molecular. El fibrinógeno no se encuentra presente debido a su peso molecular elevado, de modo que el líquido sinovial normal no coagula. La glucosa y el ácido úrico difunden libremente en la membrana sinovial y en el estado de ayuno exhiben una concentración similar a la encontrada en el plasma.

Las características del líquido sinovial normal se resumen en la Tabla 41-3.^{[refs\(1806\)](#)}

Cambio del compuesto analizado en la enfermedad

Las alteraciones físicas y químicas que se observan en el líquido sinovial durante la enfermedad reflejan los procesos patológicos básicos que tienen lugar en la articulación. En la Tabla 41-4 se resume una clasificación patológica de los líquidos sinoviales con las enfermedades asociadas en cada caso. Las pruebas de laboratorio discutidas en esta sección incluyen viscosidad, fibrinógeno, proteínas totales, complemento, glucosa y ácido úrico.

Clínicamente no es necesaria una complicada medición de la viscosidad, ya que puede ser estimada al momento de la aspiración, colocando un dedo en la punta de la jeringa y alejándolo para observar la formación de un filamento. Los líquidos no inflamatorios permiten la formación de un filamento de más de 4 cm, con una consistencia similar a la albúmina del huevo. Es posible también, dejar gotear el líquido desde la jeringa y observar si forma un

filamento largo (líquido no inflamatorio) o si gotea en forma semejante al agua (líquido inflamatorio). La despolimerización del ácido hialurónico mediante la acción de la hialuronidasa presente en los neutrófilos disminuye la viscosidad en las enfermedades inflamatorias.

La prueba del coágulo de mucina (*prueba de Ropes*) es raramente aconsejada, pero se describe frecuentemente en la literatura. Esta prueba refleja el grado de polimerización de ácido hialurónico. Se lleva a cabo dejando caer gotas del líquido en una solución ácida diluida y determinando la calidad del coágulo. Aunque esta prueba a menudo es mencionada sin comentarios críticos en las discusiones del líquido sinovial, la calidad de la información obtenida es inferior a la lograda con otros procedimientos y esta prueba debería considerarse obsoleta.

El líquido sinovial normal no contiene fibrinógeno, pero en los casos de sinovitis inflamatoria se produce el pasaje de las proteínas de alto peso molecular hacia el líquido, con paso de fibrinógeno y coagulación espontánea del líquido sinovial. Por lo tanto es necesario agregar anticoagulantes cuando se obtienen muestras destinadas al examen microscópico y bacteriológico.

A diferencia de los líquidos serosos, el contenido proteico total del líquido sinovial no se emplea para diferenciar los líquidos inflamatorios de los no inflamatorios, puesto que para llevar a cabo esa diferenciación se utiliza el conteo de leucocitos. Por consiguiente, la determinación de proteínas totales no se halla incluida en los exámenes de rutina del líquido sinovial; sin embargo, su determinación puede ser de utilidad para interpretar los niveles de complemento.^{ref(1807)} Las proteínas del complemento normalmente están en menor concentración en el líquido sinovial que en el suero. En las condiciones inflamatorias sistémicas, el complemento se comporta como una proteína de fase aguda y se produce una hipercomplementemia. En algunas condiciones, como la enfermedad de Reiter, se ha observado un nivel de complemento en el líquido sinovial incluso mayor que en el suero.

En las enfermedades sistémicas con complejos inmunes como el lupus eritematoso sistémico (LES), el complemento es consumido extensamente y puede estar reducido tanto en el suero como en el líquido sinovial. En otras enfermedades, como la artritis reumatoidea y la sinovitis viral, el complemento es consumido localmente en la sinovia, mientras que sus niveles séricos son usualmente normales o elevados.

La determinación de C_3 y C_4 mediante métodos de precipitación es preferible que medir CH_{50} , cuyos valores pueden aparecer erróneamente bajos si el líquido permanece a temperatura ambiente. Un nivel de C_4 disminuido sugiere que existe una activación de la vía clásica por complejos inmunes y resulta más sensible que C_3 o CH_{50} . Estas dos fracciones están reducidas tanto en la activación clásica como en la activación de la vía alternativa del complemento y, en caso de encontrarse disminuidos, sugieren una actividad sistémica más profunda. El modo apropiado de interpretar los niveles de complemento en el líquido sinovial es discutible. Para fines prácticos se comparan los niveles de complemento presentes en el líquido sinovial y en el plasma, y se considera que el complemento sinovial está reducido si equivale a menos del 30% de los niveles séricos. Sin embargo, en el LES y en otras enfermedades severas inducidas por complejos inmunes, ambos niveles pueden estar reducidos. En estos casos es posible comparar los niveles de complemento del líquido sinovial y suero con las proteínas totales presentes en cada uno.

La interpretación de los niveles de glucosa del líquido sinovial requiere conocer la glucemia sérica simultánea del paciente. Es conveniente llevar a cabo esta determinación en ayunas, pero esto no siempre es clínicamente posible. En la situación ideal de un ayuno de 8 horas de duración, la diferencia entre la glucosa del líquido sinovial y la glucosa del suero es inferior a los 10 mg/dL; cuando la diferencia es de 25 mg/dL o mayor, sugiere la presencia de inflamación, y diferencias superiores a los 40 mg/dL sugieren la existencia de una sepsis. En los casos en los que la determinación no se efectúe en ayunas, la presencia de niveles de glucosa en el líquido sinovial menores de la mitad de los niveles de glucosa en suero, definitivamente deben despertar la sospecha de un proceso séptico. Raramente estos hallazgos también pueden detectarse en los derrames como consecuencia de una artritis reumatoidea. La determinación de ácido láctico y succínico han sido recomendados para el diagnóstico de la artritis séptica, sin embargo, estas pruebas no han encontrado una gran aceptación.[ref\(1808\)](#)

Los niveles séricos de ácido úrico son importantes en el diagnóstico de gota. El valor de ácido úrico sinovial es similar al sérico por ello, su determinación no posee un valor diagnóstico;[ref\(1809\)](#) sin embargo, la formación de cristales de la sal monosódica del ácido úrico, y su identificación mediante microscopía de luz polarizada en el líquido sinovial, representa el elemento diagnóstico central en la artritis gotosa.

Referencias

1. Krieg AF, Kjeldsberg CR: Cerebrospinal fluid and other body fluids. In Henry JB, editor: *Clinical diagnosis and management by laboratory methods*, Philadelphia, 1991, Saunders.
2. Light RW, MacGregor MI, Luchsinger PC, Ball WC Jr: Pleural effusions: the diagnostic separation of transudates and exudates, *Ann Intern Med* 77:507-513, 1972.
3. Pare P, Talbot J, Hoefs JC: Serum-ascites albumin concentration gradient: a physiologic approach to the differential diagnosis of ascites, *Gastroenterology* 85:240-244, 1983.
4. Rector WG Jr, Reynolds TB: Superiority of the serum-ascites albumin difference over the ascites total protein concentration in the separation of "transudative" and "exudative" ascites, *Am J Med* 77:83-85, 1984.
5. Light RW, Ball WC Jr: Glucose and amylase in pleural effusions, *JAMA* 225:257-260, 1973.
6. Carr DT, Mayne JG: Pleurisy with effusion in rheumatoid arthritis, with reference to the low concentration of glucose in pleural fluid, *Am Rev Respir Dis* 85:345-350, 1962.
7. Dodson WH, Hollingsworth JW: Pleural effusion in rheumatoid arthritis: impaired transport of glucose, *N Engl J Med* 275:1337-1342, 1966.
8. Sokolowski JW Jr, Burgher LW, Jones FL Jr, et al: Guidelines for thoracentesis and needle biopsy of the pleura, *Am Rev Respir Dis* 140:257-258, 1989.
9. Sahn SA, Good JT: Pleural fluid pH in malignant effusions, *Ann Intern Med* 108:345-349, 1988.
10. Staats BA, Ellefson RD, Budahn LL, et al: The lipoprotein profile of chylous and nonchylous pleural effusions, *Mayo Clin Proc* 55:700-704, 1980.
11. Sherr HP, Light RW, Merson MH, et al: Origin of pleural fluid amylase in esophageal rupture, *Ann Intern Med* 76:985-986, 1972.
12. Dye RA, Lafaret EG: Esophageal rupture: diagnosis by pleural fluid pH, *Chest* 66:454-456, 1974.
13. Abbott OA, Mansor KA, Logan WD: Atraumatic so-called spontaneous rupture of the esophagus, *J Thorac Cardiovasc Surg* 59:67-82, 1970.
14. Geokas MC, Olsen H, Carmack C, Rinderknecht H: Studies on the ascites and pleural effusion in acute pancreatitis, *Gastroenterology* 58:950, 1970.
15. Keith LM, Zollinger RM, McCleery RS: Peritoneal fluid amylase determinations as an aid in diagnosis of acute pancreatitis, *Arch Surg* 61:930-936, 1950.

16. Donowitz M, Kerstein MD, Spiro HM: Pancreatic ascites, *Medicine* 53:183-195, 1974.
17. Salt WB, Schenker S: Amylase\Mits clinical significance: a review of the literature, *Medicine* 55:269-289, 1976.
18. Goldman M, Goldman G, Fleischner FG: Pleural fluid amylase in acute pancreatitis, *N Engl J Med* 266:715-718, 1962.
19. Lee YN: Alkaline phosphatase in intestinal perforation, *JAMA* 208:361, 1969.
20. Delany HM, Moss CM, Carnevale N: The use of enzyme analysis of peritoneal blood in the clinical assessment of abdominal organ injury, *Surg Gynecol Obstet* 42:161-167, 1976.
21. Ropes MW, Rossmeisl EC, Bauer W: The origin and nature of normal human synovial fluid, *J Clin Invest* 19:795-799, 1940.
22. Hamerman D, Schuster H: Hyaluronate in normal synovial fluid, *J Clin Invest* 37:57-64, 1958.
23. Hoepfich PD, Ward JR: *The fluids of the parenteral body cavities*, New York, 1959, Grune & Stratton.
24. Pekin TJ, Zvaifler NJ: Hemolytic complement in synovial fluid, *J Clin Invest* 43:1372-1382, 1964.
25. Pruzanski W, Russell ML, Gordon DA, Ofryzlo MA: Serum and synovial fluid proteins in rheumatoid arthritis and degenerative joint diseases, *Am J Med Sci* 265:483-490, 1973.
26. McCarty DJ: Synovial fluid. In McCarty DJ, Koopman WJ, editors: *Arthritis and allied conditions, a textbook of rheumatology*, ed 12, Philadelphia, 1993, Lea & Febiger.
27. Borenstein DG, Gibbs CA, Jacobs RP: Gas-liquid chroma-tographic analysis of synovial fluid: succinic acid and lactic acid as markers of septic arthritis, *Arthritis Rheum* 25:947-953, 1982.
28. Baker DG: Chemistry, serology, and immunology. In Gatter RA, Schumacher HR: *A practical handbook of joint fluid analysis*, ed 2, Philadelphia, 1991, Lea & Febiger.

Tablas

Tabla 41-1. Causas de derrame.

Causa	Alteración	Patogenesis
Trasudados		
Insuficiencia cardíaca congestiva	↑ PH	Hipertensión venosa sistémica y pulmonar
Cirrosis hepática	↑ PH	Hipertensión portal y de la vena cava inferior
Síndrome nefrotico	↓ PCO	Hipoalbuminemia
	↓ PCO	Hipoalbuminemia
Exudados		
Pancreatitis	↑ PC	Inflamación secundaria a lesión química
Peritonitis biliar	↑ PC	Inflamación secundaria a lesión química
Enfermedad reumatoidea	↑ PC	Inflamación de las serosas
Lupus eritematoso sistémico	↑ PC	Inflamación de las serosas
Infección (bacteriana, tuberculosis, micótica, viral)	↑ PC	Inflamación secundaria a la presencia del agente infeccioso
Infarto (miocárdico,	↑ PC	Inflamación secundaria a la



pulmonar)		extensión del proceso
Neoplasias	↑ PC	Aumento de la permeabilidad de los capilares que irrigan la masa tumoral; pleuritis secundaria a neumonitis obstructiva
	↓ DL	Obstrucción linfática debida a la infiltración de los nódulos linfáticos
Quilo		
Traumatismo		Alteración o ruptura de los conductos
Cirugía	↓ DL	
Neoplasias		
Idiopaticolinfáticos		

PH, presión hidrostática; *PCO*, presión colodsmótica; *PC*, permeabilidad capilar; *DL*, drenaje linfático.

Tabla 41-2. Criterios diagnósticos para trasudados y exudados en el derrame pleural.

Criterio	Trasudado	Exudado
Aspecto	Claro	Turbio
Fibrinógeno	No coagula	Coagula
Densidad específica	< 1.015	≥ 1.015
Proteína total	< 30 g/L	≥ 30 g/L
Proteína total (derrame/suero)	< 0.5	≥ 0.5
Lactato deshidrogenasa (derrame/suero)	< 0.6	≥ 0.6
Glucosa	~ suero	Frecuentemente < 60 mg/dL

Tabla 41-3. Características físicas y químicas del líquido sinovial normal.

	Media	Rango
Volumen (mL)*	1.1	0.13 – 3.5
Viscosidad relativa a 38° C	235	5.7 – 1160
Ácido hialurónico (g/L)	3600	1700 – 4050
Proteína total (g/L)	17.21	0.2 – 21.3
Inmunoglobulinas (mg/L)		
IgG	4530	330 – 8500

IgA	740	270 – 1770
IgM	370	0 – 840
Fibrinógeno (mg/L)	0	0
Complemento (CH ₅₀ U/mL)	20†	16 – 25
Glucosa (mg/dL)	‡	650 – 1200
Ácido úrico	‡	25 – 72

* En la rodilla; † Aproximadamente 10 % del valor plasmático; ‡ En el ayuno son similares al valor plasmático.

Tabla 41-4. Clasificación patológica del líquido sinovial.

Prueba:	Volumen (mL)
No inflamatorio:	> 3.5
Inflamatorio:	> 3.5
Séptico:	> 3.5
Hemorrágico:	> 3.5
Prueba:	Color
No inflamatorio:	Amarillo
Inflamatorio:	Amarillo-blancuecino
Séptico:	Amarillo-verdoso
Hemorrágico:	Rojo pardusco
Prueba:	Viscosidad
No inflamatorio:	Alta
Inflamatorio:	Disminuida
Séptico:	Disminuida
Hemorrágico:	Disminuida
Prueba:	Leucocitos (células/μL)
No inflamatorio:	200-2000
Inflamatorio:	2000-100,00010,000
Séptico:	>100,000
Hemorrágico:	> 500
Prueba:	Neutrófilos (%)
No inflamatorio:	< 25
Inflamatorio:	> 50
Séptico:	> 75
Hemorrágico:	> 25
Prueba:	Glucosa (mg/dL)
No inflamatorio:	~ suero
Inflamatorio:	> 250 mg/dL mas bajo que el suero
Séptico:	> 25 mg/dL mas bajo que el suero
Hemorrágico:	~ suero
Prueba:	Cultivo

No inflamatorio:	Negativo
Inflamatorio:	Negativo
Séptico:	Positivo
Hemorrágico:	Negativo
Prueba:	Patología relacionada
No inflamatorio:	Osteoartritis Osteocondritis disecante Osteocondromatosis Artritis traumático Neuroartropatía
Inflamatorio:	Gota Pseudogota Artritis psoriásica Síndrome de Reiter Artritis reumatoide Lupus eritematoso sistémico
Séptico:	Infección bacteriana Infección micótica Tuberculosis
Hemorrágico:	Hemofilia Traumatismo Sinovitis dendrítica pigmentada

Figuras

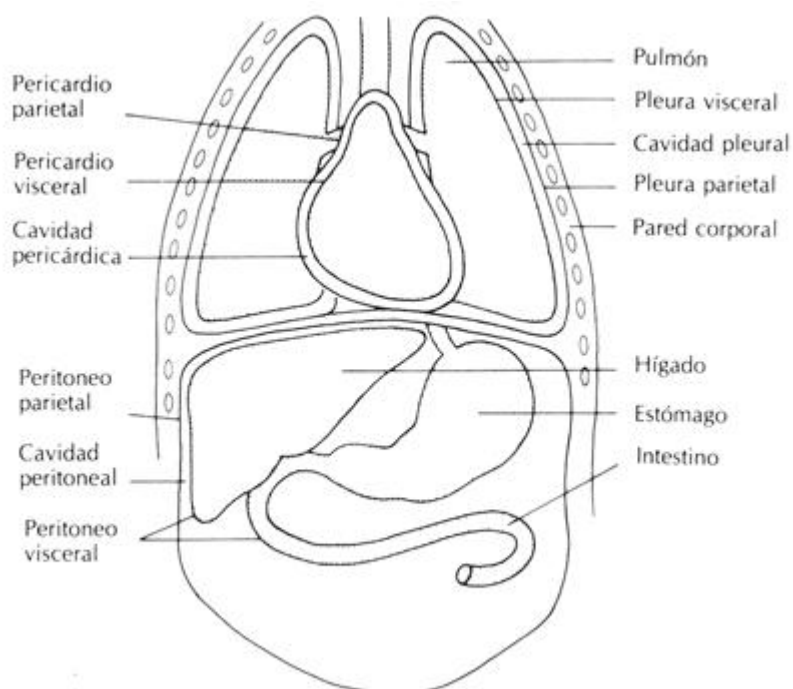


Figura 41-1 Relación entre membranas serosas, cavidades orgánicas y vísceras. El corazón se encuentra incluido en el saco pericárdico. La membrana externa del pericardio se denomina pericardio parietal. El pericardio visceral también llamado epicardio recubre la superficie exterior del corazón. El peritoneo parietal delimita la pared de la cavidad peritoneal. El peritoneo visceral rodea al estómago, hígado e intestinos. La cavidad peritoneal esta representada del espacio presente entre las dos capas del peritoneo.

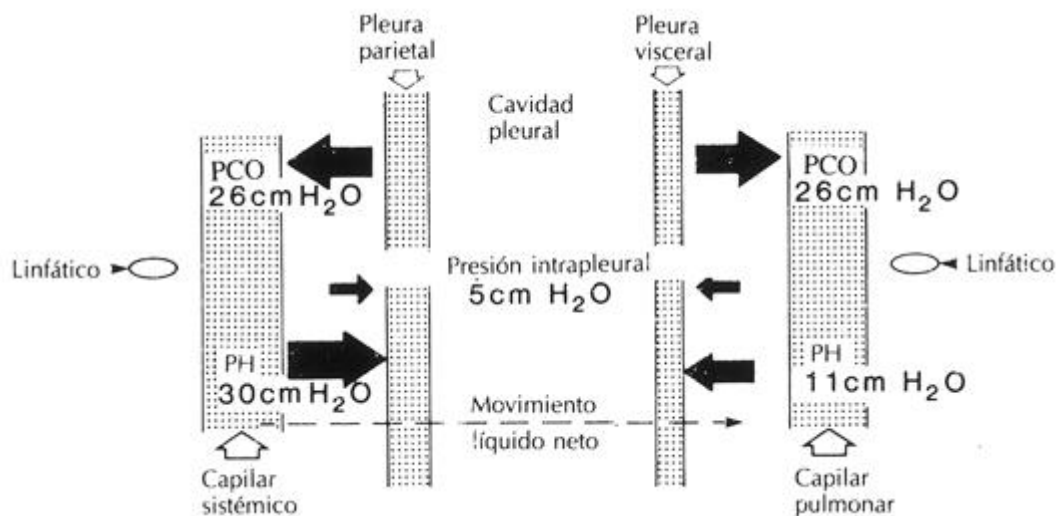


Figura 41-2 El líquido pleural se forma en la pleura parietal debido a que la fuerza neta que determina el flujo hacia el exterior del capilar sistémico excede la presión coloidosmótica neta. El fluido se mueve hacia la pleura visceral donde la presión coloidosmótica es mayor a la presión hidrostática en el capilar pulmonar. Los vasos linfáticos contribuyen a la absorción de agua, proteínas y material particulado. PCO, presión coloidosmótica; PH, presión hidrostática.

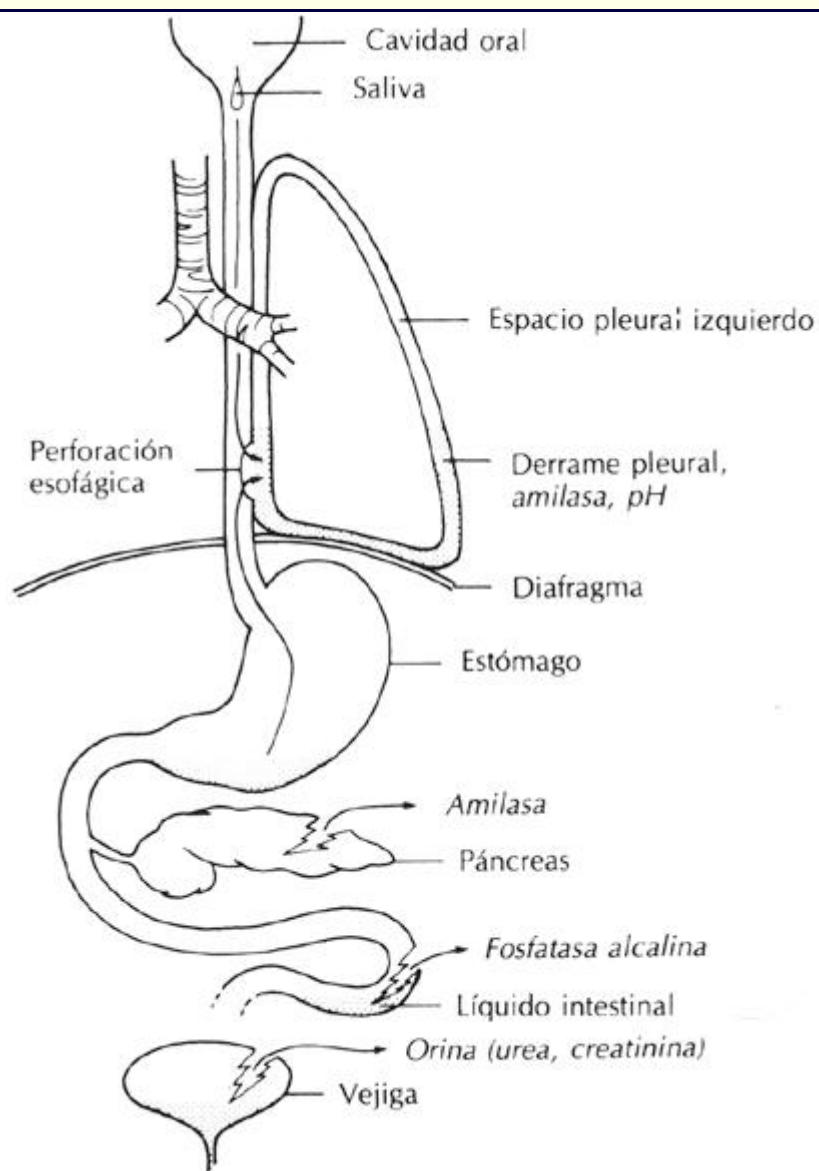


Figura 41-3 Determinaciones químicas útiles como marcadores de la participación de un órgano específico.

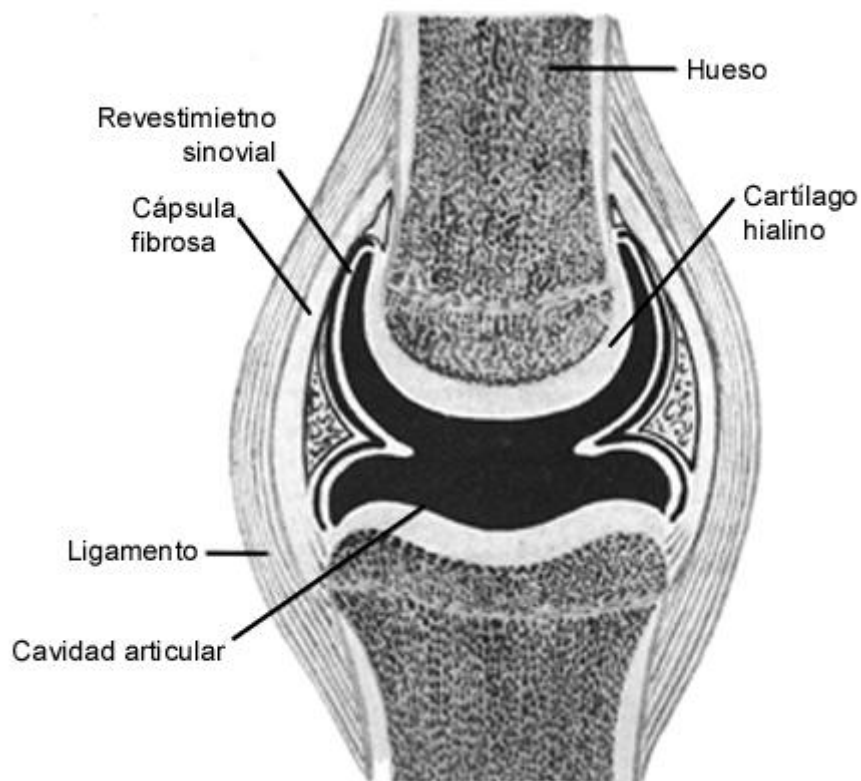


Figura 41-4 Diagrama de una articulación normal con la ubicación del líquido sinovial.
(De Beck, EW: *Mosby's atlas of functional human anatomy*, St. Louis, 1982, Mosby.)

CAPÍTULO 42

42. Sistema Nervioso

Michael D. Privitera

Christian Kohler

Neuroanatomía básica

Fisiología y bioquímica

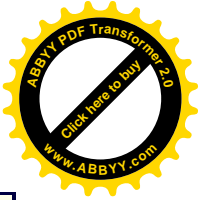
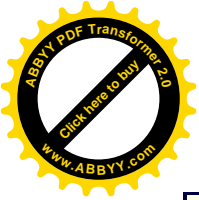
Formación de líquido cefalorraquídeo

Barrera hematoencefálica

Funciones del líquido cefalorraquídeo

Composición del líquido cefalorraquídeo

Metabolismo cerebral



Sistemas neurotrasmisores

Condiciones patológicas: neurológicas

- Coma**
- Hemorragia intracraneal**
- Infecciones**
- Enfermedades inflamatorias**
- Isquemia**
- Apoplejía**
- Isquemia cerebral difusa e hipoxia**
- Enfermedad neuromuscular**
- Síndromes neoplásicos y paraneoplásicos**
- Epilepsia**
- Intoxicación con drogas y venenos**
- Enfermedades metabólicas**
- Endocrinopatías**

Condiciones patológicas: psiquiátricas

- Esquizofrenia**
- Desordenes afectivos**
- Desordenes de ansiedad**

Prueba funcionales

- Prueba de supresión de la dexametasona**

Cambio de compuesto analizado en la enfermedad: compuestos no fármacos

- Aspecto del líquido cefalorraquídeo**
- Proteínas del líquido cefalorraquídeo**
- Síntesis de gama-globulinas**
- Bandas oligoclonales**
- Glucosa en el líquido cefalorraquídeo**
- Pruebas de funcionalidad tiroidea**
- Rastreo toxicológico**

Cambio de compuesto analizado en la enfermedad: monitoreo de fármacos terapéuticas

- Fármacos antiepilépticos**
- Medicación antipsicótica**
- Medicación antidepresiva**
- Antidepresivos atípicos**
- Ansiolíticos**
- Estabilizadores del humor**

Métodos de análisis

- Barbitúricos**



OBJETIVOS

- ◆ Definir el concepto de barrera hematoencefálica y su papel fisiológico.
- ◆ Describir la función y la composición del líquido cefalorraquídeo (LCR) y enunciar sus principales cambios en la enfermedad.
- ◆ Enlistar los principales neurotransmisores y definir su función.
- ◆ Enlistar las principales causas de coma o de alteración del estado mental.
- ◆ Enunciar seis clases de fármacos anticonvulsivos y describir los métodos más comúnmente usados para medir una de estas clases.

Términos clave

anticonvulsivantes Drogas usadas terapéuticamente para evitar las convulsiones de diversos tipos.

antipsicóticos Fármacos usadas para revertir o atenuar los síntomas psicóticos (alucinaciones, delirios y los trastornos de la consciencia).

apoplejía Instalación repentina de síntomas provocados por una isquemia cerebral aguda como consecuencia de una hemorragia, embolismo o trombosis, que se manifiesta por la pérdida de las funciones neurológicas. También llamado ictus apopléjico o infarto cerebral.

barrera hematoencefálica Barrera entre el cerebro y la sangre que permite mantener una composición del líquido cefalorraquídeo diferente a la de la sangre.

coma Estado de inconsciencia que no es posible revertir incluso mediante los estímulos más potentes.

convulsión trastorno repentino y transitorio de la función mental o de los movimientos corporales que resulta de una excesiva descarga eléctrica de un grupo de células cerebrales.

depresión Disturbo del humor descrito como el estar triste, afligido, desconsolado, decaído o irritable, acompañado de una pérdida profunda del interés o del placer por las actividades comunes o las diversiones.

epilepsia Trastorno caracterizado por la tendencia a tener convulsiones.

espacio subaracnoideo Espacio situado entre las membranas aracnoides y piamadre.

esquizofrenia Estado psicótico deteriorativo con alucinaciones, delirios y los trastornos de la cognición que duran por más de 6 meses y para el cual no se espera la recuperación total.

índice de IgG Relación entre (IgG del LCR x albúmina sérica)/(IgG sérica x albúmina del LCR), utilizada como un indicador del origen de la elevación de las proteínas en el LCR.

líquido cefalorraquídeo (LCR) Líquido claro e incoloro presente en el interior de los cuatro ventrículos cerebrales, del espacio subaracnoideo y de la médula espinal.

manía Trastorno periódico en el cual el humor es alto, expansivo o irritable, acompañado por hiperactividad, presión por hablar, conflicto de ideas, excesivo



amor propio y disminuida necesidad de sueño.

meninges Las tres membranas que recubren el cerebro y la médula espinal; duramadre, aracnoides y piamadre.

meningitis Inflamación de las meninges causada a menudo por infecciones bacterianas o vitales.

neurotransmisor Sustancia química liberada por una neurona hacia el receptor específico situado en una célula adyacente, que altera el funcionamiento de la célula.

recaptación Proceso mediante el cual las neuronas conservan sus propios neurotransmisores recuperándolos del espacio sináptico para almacenarlos y posteriormente volver a liberarlos.

receptor neuronal Proteína compleja de la membrana celular que liga a un neurotransmisor particular e inicia una serie de eventos que alteran el funcionamiento de la membrana.

sinapsis Unión estructural de dos neuronas, donde se envían mensajes químicos mediante neurotransmisores, desde la neurona presináptica hacia el receptor postsináptico.

trastorno afectivo Desorden de la regulación del humor manifestada clínicamente por episodios o períodos de depresión o manía o ambas.

trastorno afectivo bipolar Trastorno con episodios de depresión y manía presentes en el mismo paciente.

trastorno afectivo unipolar Trastorno en el cual sólo se presentan episodios de depresión, sin episodios de manía.

trastorno de ansiedad Trastorno crónico caracterizado por sentimientos inapropiados, profundos, continuos o paroxísticos de preocupación o miedo.

ventrículos Cuatro cavidades intracerebrales ocupadas por líquido cefalorraquídeo y tapizadas por la piamadre y el plexo coroideo.

xantocromía Coloración amarillenta del LCR provocada por la presencia de productos de degradación de la hemoglobina.

Neuroanatomía básica

El sistema nervioso central (SNC) se compone del cerebro y la médula espinal. El cerebro incluye los dos hemisferios cerebrales, que son casi una imagen especular uno del otro, el tronco cerebral, una estrecha estructura a través de la cual deben pasar todas las vías que ingresan y abandonan los dos hemisferios y en el que se encuentran los centros que controlan la respiración, frecuencia cardíaca, movimientos oculares y muchas otras funciones críticas, y el cerebelo, una estructura redondeada del tamaño aproximado de una pelota de béisbol que contribuye al control del movimiento y del equilibrio (Fig. 42-1). La porción inferior del tronco cerebral se une a la médula espinal, que es el sitio de salida de los nervios que se dirigen hacia los músculos y el punto de entrada de las fibras sensoriales que retornan desde los órganos sensoriales. Todos los nervios situados en el exterior del sistema nervioso



central son designados genéricamente bajo la denominación de sistema nervioso periférico.

Los dos hemisferios cerebrales están formados alrededor de un sistema conector de espacios huecos denominado sistema ventricular. Los ventrículos están ocupados por líquido cefalorraquídeo (LCR) (Fig. 42-2).

El cerebro y la médula espinal están recubiertos por una serie de membranas denominadas meninges (Fig. 42-3). Su capa interna, denominada aracnoides se ubica por debajo de la cubierta más externa del cerebro y de la médula espinal, la duramadre o dura. La dura es una membrana resistente, no elástica que envuelve al cerebro y a la médula espinal en un saco no distensible. De esta forma, el cerebro, la sangre y el LCR se encuentran confinados a un espacio cuyo volumen es fijo. El espacio situado entre la piamadre y la aracnoides se denomina espacio subaracnoideo y comunica directamente con el sistema ventricular.

Fisiología y Bioquímica

Formación del líquido cefalorraquídeo

El sistema ventricular y el espacio subaracnoideo están ocupados por el líquido cefalorraquídeo (LCR). El volumen total de LCR en los adultos es de aproximadamente 150 ml. El LCR es producido y reabsorbido constantemente con una velocidad de aproximadamente 500 ml/día (0,35 mL/min). Esto significa que la cantidad total de LCR es reemplazada cada 6 a 8 horas.

El LCR es producido en los ventrículos por una estructura especializada similar a una esponja denominada plexo coroideo. El LCR pasa de los ventrículos laterales, en donde se forma, al tercer ventrículo y luego al cuarto ventrículo. Abandona el cuarto ventrículo a través de tres pequeños orificios, o forámenes, para circular a través del espacio subaracnoideo intracraneano y espinal. La circulación del LCR puede ser bloqueada en cualquiera de los ventrículos o a nivel de los forámenes que los comunican, dando lugar a una hidrocefalia obstructiva (acumulación de líquido en el cerebro).

El LCR producido en forma constante, es absorbido a nivel de las vellosidades y granulaciones aracnoideas para mantener su volumen constante. Estas vellosidades y granulaciones subaracnoideas se encuentran diseminadas a lo largo del cráneo y del canal raquídeo hasta los sitios en que los nervios raquídeos atraviesan la dura. Por lo tanto, la reabsorción de LCR puede producirse a lo largo de la totalidad del eje neural. Si la absorción se altera, (por ejemplo, después de una inflamación meníngea, una meningitis bacteriana o una hemorragia subaracnoidea), la presión del sistema nervioso central y el volumen del LCR se incrementan, produciendo un cuadro denominado hidrocefalia comunicante.

Los factores que determinan la velocidad con la que el LCR es formado y absorbido son complejos y no están completamente dilucidados. Cualquier incremento del volumen de uno de los componentes (es decir, cerebro, LCR o sangre) conduce a un incremento marcado de la presión en el interior del sistema, a menos que se produzca una disminución equivalente del volumen de uno de los otros dos componentes. Cuando la presión del LCR aumenta, el cerebro puede sufrir los efectos directos del incremento anormal de la presión o como consecuencia de una disminución del flujo sanguíneo.

Barrera hematoencefálica

El término barrera hematoencefálica se usa para designar una barrera fisiológica que

separa el cerebro y el LCR de las sustancias transportadas en la sangre. La barrera hematoencefálica permite el mantenimiento de la composición del cerebro y del LCR a niveles considerablemente diferentes a la sangre en lo que se refiere a proteínas, iones y otros elementos moleculares. La barrera hematoencefálica es sumamente importante en la práctica clínica, pues determina el acceso de los antibióticos al cerebro y meninges y contribuye al delicado control ejercido sobre el medio químico cerebral a pesar de la aparición de cambios simultáneos en la sangre periférica.

El compartimento de líquido extracelular (LEC) del cerebro mantiene una comunicación relativamente libre con el LCR, mientras que existe una barrera entre la sangre capilar y la combinación de los compartimentos del LEC y LCR.

Los factores que influyen significativamente sobre el acceso de las sustancias al cerebro y al LCR incluyen peso molecular, fijación de proteínas y liposolubilidad. Respecto al peso molecular, el ingreso es inversamente proporcional al tamaño de la molécula, por ello la relación de 1/200 de la albúmina del LCR respecto al plasma (p_m de la albúmina = 69,000 daltones). Las drogas con gran capacidad de fijación a proteínas ingresan mucho menos fácilmente al LCR que las sustancias no fijadas de menor peso molecular. Por ejemplo, la fenitoína se encuentra fijada a las proteínas en una proporción del 90% y con un 10% de fenitoína libre en sangre. Sólo un 10% de la fenitoína sanguínea total es capaz de ingresar con facilidad al LCR y únicamente ese 10% es "activo". Calcio, magnesio y metabolitos como la bilirrubina que se encuentran fuertemente unidos a proteínas, no penetran fácilmente en el LCR. Las sustancias altamente liposolubles, como el monóxido de carbono, drogas neuroactivas y alcohol, ingresan fácilmente al sistema nervioso central. Las sustancias que se encuentran altamente ionizadas a pH fisiológico están relativamente excluidas del LCR. Las sustancias altamente polares, como algunos aminoácidos, ingresan lentamente y requieren un mecanismo de transporte activo.

La barrera hematoencefálica es rápidamente permeable al agua, pero no a los electrólitos. Los principales cationes (sodio y potasio) requieren de horas para lograr un equilibrio con el LCR después de la aparición de modificaciones en la sangre periférica. Las alteraciones de la osmolalidad sanguínea se acompañan de cambios paralelos en el LCR después de un período de latencia de pocas horas.

En el caso de fármacos, su pK_a , o constante de disociación iónica es importante para determinar la facilidad con las que estas sustancias pueden atravesar la barrera hematoencefálica. El pK_a se refiere al pH al cual se encuentra ionizado el 50% de un compuesto. Un fármaco no ionizado es relativamente liposoluble y por lo tanto ingresa más libremente al SNC, mientras que la fracción polar ionizada será relativamente excluida.

Finalmente, las características de la barrera hematoencefálica pueden alterarse notablemente en estados patológicos. La penicilina, una sustancia ácida, normalmente no ingresa al SNC después de una inyección parenteral, no obstante es un agente terapéutico efectivo en el tratamiento de la meningitis. La explicación es que la inflamación meníngea altera la barrera hematoencefálica, facilitando el acceso de fármacos, como la penicilina, que normalmente no podrían llegar hasta el tejido infectado.

Algunos factores específicos que alteran la permeabilidad de la barrera hematoencefálica son los siguientes:

1. La inflamación. Puede incrementar la capacidad de ingreso al SNC de

macromoléculas como la albúmina y la penicilina.

2. La neovascularización. asociada por ejemplo con tumores, traumatismo o isquemia, altera el estado de la barrera hematoencefálica. Esto puede deberse a defectos presentes en los nuevos vasos sanguíneos o a la inmadurez de estos vasos.
3. Las toxinas pueden modificar las características de la barrera hematoencefálica. y algunos agentes empleados en estudios radiográficos incrementan su permeabilidad a través de efectos tóxicos directos. Cuando estos agentes son inyectados en concentraciones hiperosmolares el efecto es mayor.
4. Finalmente, la barrera hematoencefálica del sistema nervioso inmaduro es más permeable a una variedad de sustancias. En los niños menores de 6 meses, el contenido proteico del LCR alcanza normalmente el valor de 100 mg/L.

Funciones del líquido cefalorraquídeo

¿Por que el cerebro se encuentra inmerso y bañado por este líquido particular? En primer lugar, el LCR proporciona un sostén mecánico para el cerebro. En segundo lugar, el LCR probablemente contribuye a la remoción de productos metabólicos del cerebro, función que no se ha dilucidado aún, pero que probablemente sea importante tanto en los estados fisiológicos como patológicos. En tercer lugar existen algunos datos que indican que el LCR transporta compuestos biológicamente activos que podrían funcionar como mensajeros químicos. Finalmente, el LCR desempeña un papel importante en el mantenimiento del medio químico del cerebro. Aunque su comunicación con el compartimiento plasmático se encuentra estrechamente regulada, el LCR parece establecer una comunicación relativamente libre con el compartimiento de líquido extracelular del cerebro, que contribuye al funcionamiento de las células cerebrales propiamente dichas. La sección siguiente examina con mayor detalle la composición del líquido cefalorraquídeo.

Composición del líquido cefalorraquídeo

La composición iónica y molecular del LCR difiere de la del plasma en el caso de algunos componentes y es idéntica en el de otros (ver el siguiente cuadro). Las alteraciones en la concentración sérica de sodio se acompañan de alteraciones correspondientes del nivel de sodio en el LCR, de modo que, después de un período de 1 hora, las concentraciones de sodio son casi las mismas en ambos medios. Sin embargo, el nivel de potasio del LCR es inferior al del plasma y además es mantenido dentro de un intervalo de concentración muy pequeño en el LCR a pesar de la existencia de amplias fluctuaciones de los niveles plasmáticos. Estas diferencias parecen deberse en gran parte a un proceso de transporte activo para la entrada y salida del LCR. El cloro y el magnesio muestran una concentración algo más elevada en el LCR que en el plasma, y el bicarbonato está algo más reducido en el LCR.

La concentración de glucosa del LCR normalmente oscila entre 45 y 80 mg/dL (2.5 a 4.44 mmol/L), es decir, entre un 60 y un 80% de la concentración de glucosa en sangre una vez alcanzado el equilibrio. La glucosa sanguínea y del LCR se equilibran después de un período de latencia de aproximadamente 4 horas, de modo que la concentración de glucosa en el LCR en un momento dado refleja los niveles de glucosa sanguínea durante las últimas 4



horas. Cuando se lleva a cabo una punción lumbar (PL) con el objeto de determinar la concentración de glucosa en el LCR es necesario obtener una muestra simultánea de sangre periférico. La concentración de glucosa en el LCR es modificada por ciertos procesos patológicos, como se discutirá más adelante. El nivel de glucosa en el LCR es definitivamente anormal cuando equivale a menos del 40% de la glucemia determinada simultáneamente; valores inferiores a 40-45 mg/dL son casi siempre anormales.

Debe tenerse en cuenta que el porcentaje esperado de glucosa del LCR respecto a la glucosa en sangre (entre 60 a 80%), desciende a medida que la glucosa sanguínea aumenta. Es decir, es de esperar una relación glucosa del LCR/glucosa en sangre de 0.5 cuando los valores de la glucemia alcanzan los 500 mg/dL y una relación de 0.4 si la glucemia llega a los 700 mg/dL.

Las proteínas halladas en el LCR usualmente se originan en el suero y alcanzan el espacio del LCR mediante un proceso de pinocitosis a través del endotelio capilar. La relación normal entre la proteína séricas y las proteínas del LCR es de 200:1 (con una concentración sérica de 70 g/L y una concentración en el LCR de 350 mg/L).

Características del Líquido Cefalorraquídeo Normal	
<i>Volumen total:</i> 150 mL.	
<i>Color:</i> Incoloro, como el agua	
<i>Transparencia:</i> Claro como el agua	
<i>Osmolaridad a 37° C:</i> 281 mOsm/L	
<i>Gravedad específica:</i> 1.006 a 1.008	
<i>Balance ácido-base:</i>	
pH	7.31
PCO ₂	47.9 mm Hg
HCO ₃ ⁻	22.9 mEq/L
<i>Sodio:</i> 138 a 150 mEq/L	
<i>Potasio:</i> 2.7 a 3.9 mEq/L	
<i>Cloruro:</i> 116 a 117 mEq/	
<i>Calcio:</i> 2.0 a 2.5 mEq/L (40 a 50 mg/L)	
<i>Magnesio:</i> 2.5 a 2.5 mEq/L (24.4 a 30.5 mg/L)	
<i>Lactato deshidrogenasa:</i> La actividad absoluta depende del método; aproximadamente 10% del valor sérico	
<i>Glucosa:</i> 450 a 800 mg/L	
<i>Proteínas:</i> 200 a 400 mg/L	
En diferentes niveles de la columna:	
Lumbar	200 a 400 mg/L
Cisternal	150 a 250 mg/L
Ventricular	150 a 100 mg/L
<i>Separación electroforética de proteínas de líquido cefalorraquídeo (% de la concentración de proteína total)</i>	
Prealbúmina	2% a 7%



Albúmina	56% a 76%
α_1 -globulina	2% a 7%
α_2 -globulina	3.5% a 12%
β y γ -globulina	8% a 18%
γ -globulina	7% a 12%
IgG	10 a 40 mg/L
IgA	0 a 0.2 mg/L
IgM	0 a 0.6 mg/L
Relación κ/λ	1
<i>Cuenta eritrocitaria:</i>	
Recién nacido	0 a 675/mm ³
Adulto	0 a 10/mm ³
<i>Cuenta leucocitaria:</i>	
<1 año de edad	0 a 30/mm ³
1 a 4 años	0 a 20/mm ³
5 años hasta la pubertad	0 a 10/mm ³
Adulto	0 a 5/mm ³

Metabolismo cerebral

El índice metabólico del cerebro es uno de los más elevados del organismo humano, ya sea en estado de vigilia o durante el sueño, pero, a diferencia de la mayoría de los otros órganos, los cuales almacenan y reservan un cierto aporte energético para su mantenimiento, el cerebro no posee prácticamente ninguna reserva energética. Su metabolismo depende enteramente del aporte ininterrumpido de glucosa y oxígeno desde la sangre periférica. El cerebro utiliza casi exclusivamente glucosa para cubrir sus necesidades energéticas (vea capítulo 32). Para poder tener una idea acerca del grado de avidez del cerebro y de su dependencia de un flujo de sangre adecuado y constante, debe tenerse en cuenta que, en condiciones de reposo, el flujo sanguíneo cerebral total equivale a un 15 a 20% del volumen minuto cardíaco (aproximadamente 500 ml por 100 g de tejido cerebral al minuto). Aunque el flujo sanguíneo cerebral total permanece notablemente constante, discretas áreas en el interior del cerebro muestran sorprendentes variaciones. La sustancia gris recibe un flujo sanguíneo tres a cuatro veces mayor que el destinado a la sustancia blanca. Además se conoce que el flujo sanguíneo regional se incrementa en las áreas diversas durante tareas como el movimiento de las manos, la dicción o la resolución de problemas mentales. El flujo sanguíneo también experimenta alteraciones en respuesta a estados patológicos, como ocurre en el caso de un ataque de apoplejía.

Sistemas neurotransmisores

Las neuronas del sistema nervioso central procesan la información recibida desde

múltiples fuentes internas y externas. Para mantener el equilibrio fisiológico y psicobiológico, las neuronas del SNC se comunican entre si y eventualmente con otros efectores al exterior del SNC mediante neurotransmisores liberados por cada neurona a nivel de receptores específicos. Las neuronas se caracterizan por su distribución anatómica, sus vías de proyección hacia las áreas de innervación y por la naturaleza de la hormona o transmisor neuroquímico que sintetizan y liberan (Fig. 42-4).

La función del neurotransmisor es propagar un impulso eléctrico desde una neurona hacia otra. El impulso eléctrico viaja a través de la neurona dando origen a la liberación de un neurotransmisor desde las vesículas presinápticas en las cuales ha sido sintetizado y almacenado. De esta forma, miles de moléculas de neurotransmisor son liberadas a la hendidura sináptica, el espacio entre las neuronas presináptica y postsináptica, donde se unen a receptores específicos del transmisor de la neurona postsináptica y producen el impulso de excitación o inhibición según el caso. En la hendidura sináptica, los neurotransmisores son degradados enzimáticamente. Los productos metabólicos de esta degradación se ligan a receptores de la membrana presináptica que permiten su recaptación hacia la neurona presináptica para formar un nuevo neurotransmisor.

Norepinefrina.

La norepinefrina se forma en las neuronas presinápticas noradrenérgicas a partir de tiroxina con dopa y dopamina como intermediarios (Fig. 42-5). La norepinefrina produce una respuesta estimuladora en los receptores postsinápticos. En la hendidura sináptica, el neurotransmisor puede degradarse a 3-metoxi-4- hidroxifenilglicol (MHFG) o ser captado por la neurona presináptica, donde es metabolizada por una enzima citoplásmica llamada monoamina oxidasa, posteriormente los productos de degradación se utilizan para resintetizar la norepinefrina. Mediante este mecanismo, la neurona noradrenérgica recupera la mayor parte de la norepinefrina liberada a la hendidura sináptica. Eventualmente, el MHFG puede atravesar la barrera hematoencefálica, entrar a la circulación y ser excretado en la orina; aproximadamente el 50% del MHFG urinario deriva del SNC.

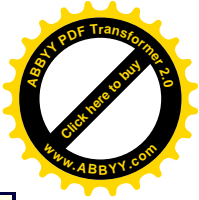
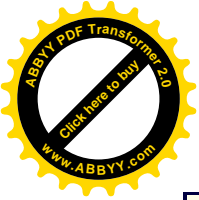
Dopamina.

La dopamina se forma en las neuronas dopamínicas por la misma vía metabólica que se muestra en la Fig. 42-5, en las cuales faltan las enzimas necesarias para la ulterior conversión de la dopamina en norepinefrina. Estas neuronas van desde el tallo cerebral hasta la sistema límbico y la corteza frontal. La dopamina presenta una acción principalmente de inhibición. Se conocen de cinco a siete diferentes receptores dopamínicos que pueden tener relevancia en el tratamiento farmacológico de los trastornos mentales. La dopamina se metaboliza a ácido homovanílico que se excreta en la orina.

Acetilcolina.

La acetilcolina fue el primer neurotransmisor descrito, se forma en las neuronas colinérgicas a partir del acetil CoA, un metabolito ubicuo, y la colina, derivada del metabolismo lipídico. La enzima clave de esta reacción es la colina acetiltransferasa.

Una vez liberado de las vesículas presinápticas a la hendidura sináptica, la acetilcolina se liga a los receptores postsinápticos actuando con efecto estimulante. En la hendidura sináptica, la acetilcolina es degradada por la acción de la enzima acetilcolinesterasa. El 10 %



de todas las sinápsis del sistema nervioso central y periférico utilizan la acetilcolina. Estas sinápsis están localizadas en todas las uniones neuromusculares, la mayor parte del sistema nervioso autónomo y en el cerebro, en áreas como los senderos motores, el hipocampo, que forma parte del sistema límbico, los ganglios basales, etc.

Serotonina (5-hidropoxitriptamina, 5-HT).

La serotonina se forma en las neuronas serotoninérgicas presinápticas a partir del aminoácido triptofano, a través de hidroxitriptofano. La mayoría de las neuronas serotoninérgicas se originan en los núcleos de raquí en las pons, desde donde las proyecciones se difunden a lo largo del cerebro y la médula espinal. Los núcleos de raquí son parte de la formación reticular, que regula la vigilia en general. La serotonina a los receptores postsinápticos de 5-hidroxitriptamina, donde genera una respuesta excitatoria. Tanto serotonina como su metabolito, el ácido 5 hidroxindolacético (5-HIAA) se incorporan en la neurona presináptica

GABA (ácido gama-aminobutírico).

El GABA se forma por descarboxilación del aminoácido glutamato. El GABA es un neurotransmisor usado por el 30 a 40% de todas las sinápsis del cerebro y está localizado profusamente en el cerebro, el tallo cerebral y la médula espinal, en donde actúa con acción inhibitoria. El receptor postsináptico del GABA también puede unirse con fármacos como fenobarbital, valproato y benzodiazepinas.

Condiciones Patológicas: Neurológicas

La pérdida de la función neural que da lugar a los estados patológicos es consecuencia de anomalías en las vías bioquímicas de los neurotransmisores. Por ejemplo, en la etapa inicial de la enfermedad de Alzheimer existe una considerable disminución de la actividad de la colina-acetiltransferasa seguido de la degeneración de las neuronas que utilizan acetilcolina. La pérdida de actividad de la acetilcolina en el hipocampo podría explicar el síntoma de pérdida de la memoria reciente en la enfermedad de Alzheimer, ya que el hipocampo está involucrado en la adquisición de la memoria. En la enfermedad de Huntington se observa una degeneración de las neuronas colinérgicas de los ganglios basales, que contribuyen a los trastornos del movimiento y la demencia propios de la enfermedad de Huntington. Se postula que existe una disfunción de los sistemas GABA-érgicos en la epilepsia generalizada idiopática, la enfermedad de Huntington y los trastornos de ansiedad. Los estados clínicos de enfermedad atribuibles a la disfunción de las neuronas dopamínicas varían de acuerdo a la localización anatómica de las neuronas involucradas. La alteración funcional de las neuronas dopamínicas del tallo cerebral a la corteza frontal y el sistema límbico pueden contribuir a los síntomas clínicos de la esquizofrenia, mientras que la alteración de neuronas dopamínicas del tallo cerebral al cuerpo estriado está relacionado con trastornos del movimiento como los de la enfermedad de Parkinson.

Las lesiones producidas en áreas discretas (focales) del cerebro o de la médula espinal provocan signos y síntomas predecibles como la parálisis de un brazo, pierna o mitad del cuerpo, pérdida de la capacidad de hablar o de comprender el lenguaje hablado,



incoordinación, pérdida visual o sensorial. Las alteraciones difusas del tejido cerebral, conducen por otro lado, a la aparición de un cuadro clínico característico. La disminución de diversas funciones intelectuales, como la atención, concentración, juicio crítico, memoria, capacidad de resolución de problemas, representan hallazgos tempranos en los casos de enfermedades difusas leves. Otros síntomas incluye las modificaciones del estado de alerta, las cuales comienzan con una consciencia borrosa para seguir luego con somnolencia, estupor y coma. Una transmisión nerviosa excesiva y sincronizada puede causar un trastorno repentino y transitorio de la función mental o de los movimientos corporales, llamada convulsión. Las convulsiones pueden acompañar tanto a las lesiones difusas como a las lesiones focales.

Diversos estados patológicos tienden a producir lesiones cerebrales focales o difusas, de modo que los patrones de déficit descritos antes, a menudo ayudan al clínico a llevar a cabo un diagnóstico específico. Algunos ejemplos de condiciones capaces de provocar lesiones focales incluyen la apoplejía causada por una oclusión vascular o por una hemorragia; traumatismos; abscesos cerebrales y tumores. Muchas de estas patologías también se acompañan de alteraciones del LCR debido a modificaciones de la barrera hematoencefálica (elevación de las proteínas) o a la inducción de alteraciones inflamatorias (leucocitosis), necrosis tisular (elevación de las proteínas y el recuento celular) o el pasaje de células tumorales (observadas en las muestras citológicas).

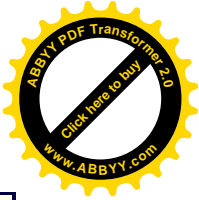
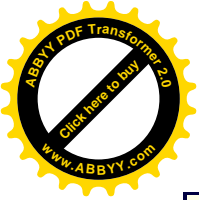
Los ejemplos de condiciones asociadas con una disfunción cerebral difusa (estados encefalopáticos) incluyen la anoxia, isquemia generalizada, hipoglucemia, sepsis, anormalidades tiroideas, coagulación intravascular diseminada y la totalidad de los trastornos metabólicos y tóxicos. El diagnóstico de estos estados a menudo se basa en los hallazgos de laboratorio.

Un resumen de algunos de los cambios clínicos y patológicos comúnmente encontrados en diversas condiciones se discute brevemente a continuación.

Coma

El coma puede definirse como un estado de inconsciencia del cual el paciente no puede ser sustraído. El coma representa solamente una de las alteraciones del estado de consciencia que pueden observarse en un paciente. La confusión es el estado de alteración más leve de la consciencia, el cual se manifiesta por una desorientación temporal, somnolencia y disminución del espectro de la atención. El estupor describe un estado en el que el paciente no muestra respuesta pero que puede ser revertido hacia un estado cercano al normal mediante los estímulos apropiados

Un paciente con un estado de alteración mental, como se observa con frecuencia en una sala de urgencia, debe recibir en primer lugar el apoyo necesario como para mantener las funciones vitales, como la ventilación. El paso siguiente consiste en determinar la causa subyacente de la alteración del estado de consciencia. Las causas fácilmente tratables deben ser tratadas, como el coma por hipoglucemia severa que puede aliviarse mediante la administración de dextrosa. La Tabla 42-1 menciona las causas más importantes de coma y de alteración del estado mental, las cuales incluyen problemas metabólicos, estructurales o infecciosos. Muchas de estas causas son descritas en detalle a continuación.



Hemorragia intracraneana

El sangrado proveniente de un vaso sanguíneo situado en la superficie cerebral, como en el caso de un aneurisma arterial, determina el flujo de sangre entre la superficie del cerebro y las capas piamadre y aracnoides dando lugar a la denominada hemorragia subaracnoidea. La sangre se mezcla con el LCR y es posible detectar la presencia de eritrocitos. Por otra parte, dado que la sangre es una sustancia extremadamente irritante cuando escapa de sus canales vasculares habituales, puede generar una respuesta inflamatoria en las meninges llamada meningitis química y provocar una migración leucocitaria hacia el LCR de las meninges irritadas. Dado que las meninges son sensibles al dolor, la hemorragia subaracnoidea típicamente causa una cefalea aguda y severa.

Enfermedades infecciosas

Tanto el tipo de organismos bacterianos o virales responsables, como las estructuras intracraneanas invadidas, determinan las alteraciones del LCR observadas en los procesos infecciosos. Los parámetros del LCR que reflejan la invasión del SNC por un agente infeccioso consisten en el recuento total y diferencial de leucocitos, la concentración de glucosa y, en un menor grado, la concentración proteica.

La meningitis es una inflamación de las meninges que genera diversos cuadros clínicos. La meningitis bacteriana o purulenta se asocia con una leucocitosis polimorfonuclear (PMN) del LCR, con cifras que van desde algunos leucocitos hasta varios miles de PMNs. Los niveles de glucosa pueden alcanzar valores notablemente reducidos y las proteínas pueden estar elevadas. En una fase más tardía de la enfermedad, los linfocitos pueden aparecer en forma prominente o dominante, especialmente si la infección ha sido parcialmente tratada con antibióticos. El tratamiento parcial de la meningitis bacteriana que no logra erradicar la enfermedad, puede producir hallazgos confusos en el LCR, dificultando el diagnóstico.

La meningitis viral se manifiesta por una leucocitosis exclusiva o predominante linfocítica. En la encefalitis por herpes simplex se pueden observar eritrocitos. La glucosa usualmente se mantiene en el intervalo normal pero disminuye en la parotiditis, el herpes simplex y el herpes zoster. En estas enfermedades, las proteínas se encuentran usualmente en el intervalo de referencia o ligeramente elevadas.

Los hongos también pueden invadir el SNC produciendo en el LCR una linfocitosis con un aumento de las proteínas, mientras que la glucosa se mantiene en el rango de referencia.

La presencia de bacterias deben ser investigada mediante la coloración de Gram y cultivo del LCR. Los virus pueden ser estudiados mediante las pruebas serológicas apropiadas o cultivo, y los hongos pueden ser detectados a través de cultivo o procedimientos inmunológicos, así como también mediante una tinción adecuada. Por ejemplo, la observación cuidadosa con tinta china puede revelar la presencia de criptococos.

Los hallazgos del LCR en la sífilis dependen del estadio de la enfermedad, de la actividad del proceso y de si se ha aplicado un tratamiento previo con dosis adecuadas. La pleocitosis en este caso, es de carácter linfocítica o mononuclear, con recuentos de leucocitos que van de 100 a 1000 /microlitro y las proteínas del LCR pueden elevarse. La prueba de VDRL (Venereal Disease Research Laboratory) del LCR y el FTA (fluorescent treponemal antibody) sérico son habitualmente positivos y puede revelarse la presencia de bandas



oligoclonales.

Los microorganismos pueden invadir también la sustancia cerebral, en tal caso se emplea el término encefalitis. Los hallazgos del LCR son comparables a los de la meningitis o pueden ser muy escasos.

La formación de abscesos en el cerebro puede no provocar alteraciones del LCR, incluso en casos de infecciones potencialmente letales.

Por último, cualquiera de las condiciones mencionadas anteriormente pueden conducir y a menudo lo hacen, a un incremento de la presión del LCR. Esto es especialmente cierto en el caso de una meningitis, que obstruye el flujo habitual del LCR con aparición de hidrocefalia obstructiva. La meningitis también puede alterar la absorción del LCR, originando una hidrocefalia comunicante.

Existe una variedad de microorganismos que generalmente no causa infecciones graves en los individuos sanos, pero que pueden producir infecciones que ponen en riesgo la vida de individuos con el sistema inmune comprometido. Los pacientes a riesgo de estas infecciones oportunistas incluyen aquellos con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), cáncer, o aquellos que reciben por otras razones fármacos inmunosupresores (por ejemplo, para tratar una enfermedad inmuno-mediada como la miastenia gravis).

El SIDA es causado por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) y es invariablemente fatal. La invasión directa del HIV al sistema nervioso puede producir diversas manifestaciones neurológicas, además de predisponer a los individuos afectados hacia infecciones oportunistas e inusuales tumores malignos que involucran el SNC. Las infecciones oportunistas, las neoplasias relacionadas al SIDA o el HIV pueden afectar el cerebro, la medula espinal o los nervios periféricos; comúnmente la afectación de múltiples sitios corresponde a múltiples causas. La presencia de bandas oligoclonales y la elevación de las proteínas del LCR es frecuentemente encontrado en la infección directa del HIV al SNC. La tumores del SNC mayormente encontrados son el linfoma y la metástasis del sarcoma de Kaposi, mientras que las infecciones más comunes son la toxoplasmosis, la leucoencefalopatía multifocal progresiva, los granulomas fúngicos y micobactericos y la encefalitis por herpes simplex.

La enfermedad de Lyme, identificada por primera vez en 1975, de un brote de casos en Old Lyme, Connecticut, es causada por la espiroqueta *Borrelia burgdorferi* inoculada mediante la mordedura de garrapatas infectadas. Los síntomas clínicos incluyen artritis, meningitis, radiculitis, neuropatía y en los estados avanzados trastornos de la concentración, la memoria y el sueño. El diagnóstico se realiza mediante la demostración de IgG e IgM específicas en el suero, sin embargo el LCR típicamente presenta aumento del recuento celular y las proteínas, así como la presencia de bandas oligoclonales.

Enfermedades inflamatorias

La esclerosis múltiple y la sarcoidosis son enfermedades inflamatorias del SNC de origen desconocido. La Esclerosis Múltiple (EM) usualmente afecta adultos jóvenes, produce numerosas áreas de desmielinización del SNC y se caracteriza por un adelgazamiento de curso progresivo. El diagnóstico de EM se realiza más eficientemente mediante imágenes de resonancia magnética en las cuales, un 90% de los pacientes presentan lesiones de la materia blanca. El análisis del LCR puede, no obstante, contribuir al diagnóstico de muchos casos.



En la EM se observan principalmente cinco alteraciones del LCR: (1) una pleocitosis mayor de 40 células/(l, (2) una elevación de las proteínas mayor de 1000 mg/L, (3) un aumento de las IgG, (4) la presencia de bandas oligoclonales y (5) elevación de la proteína miélinica básica. Desafortunadamente, ninguna de estas alteraciones es específica para la EM.

La sarcoidosis consiste en una enfermedad generalizada de causa ignota que puede afectar el sistema nervioso. En este trastorno los niveles séricos de enzima convertidora de la angiotensina (ACE) se encuentran elevados, mientras que el LCR muestra elevaciones de las proteínas y la celularidad, y ocasionalmente descenso de los niveles de glucosa.

Isquemia

Aunque el cerebro es totalmente dependiente de la glucosa como fuente de energía, sus reservas son mínimas. En presencia de oxígeno, la utilización de los depósitos de glucosa almacenados en el cerebro propiamente dicho sólo permitiría cubrir los requerimientos del cerebro durante 2 a 3 minutos. Si existe una interrupción del aporte tanto de glucosa como de oxígeno, como sucede en la isquemia, la glucólisis se convertirá en la fuente predominante de energía y los depósitos cerebrales de glucosa pueden cubrir las demandas metabólicas durante sólo 14 segundos. Cuando el aporte de energía metabólica se detiene, se produce una alteración de la integridad de las membranas celulares, el potasio sale de las células, se da una pérdida del equilibrio osmótico y un ingreso de líquido en las células lesionadas, las cuales comienzan a morir en pocos segundos.

El término isquemia se refiere al flujo sanguíneo inadecuado hacia los tejidos. En el caso del cerebro, la isquemia puede encontrarse debido a numerosas causas. Por ejemplo, si el corazón se detiene, el flujo sanguíneo cerebral total se interrumpe; si la presión sanguínea desciende en forma suficientemente importante, el flujo sanguíneo se vuelve inadecuado; si un vaso sanguíneo voluminoso aislado, como la arteria carótida, sufre un estrechamiento, la sangre que irriga el cerebro será escasa. Si un vaso sanguíneo cerebral es ocluido por un émbolo o una placa aterosclerótica, el tejido irrigado por dicho vaso sufrirá un proceso de isquemia. Otros vasos sanguíneos usualmente tratan de compensar este defecto, pero si el área cerebral irrigada por el vaso ocluido no puede ser irrigada en forma compensatoria por los vasos circundantes colaterales, los tejidos isquémicos sufrirán la muerte celular. Esta eventualidad es denominada infarto cerebral o apoplejía.

Infarto cerebral o apoplejía

Cuando ocurre el infarto cerebral, las funciones que desempeña el área infartada se afectan. Por ejemplo, si la lesión afecta el área que controla la fuerza y el movimiento a nivel de una extremidad o de un lado del cuerpo, dicha extremidad o dicho lado del cuerpo mostrarán una debilidad o una parálisis. Si es afectada el área correspondiente al habla, el paciente puede perder la capacidad de hablar o de comprender el significado de lo que escucha. La región cerebral lesionada o muerta libera proteínas en el interior del líquido cefalorraquídeo. Además, dado que los vasos sanguíneos de dicha región también se encuentran afectados por la isquemia, puede producirse hemorragia. En el LCR pueden aparecer solamente unas pocas células, lo que indica que sólo ha filtrado una escasa cantidad de sangre desde el área afectada, o el LCR puede ser francamente sanguinolento si se produce una hemorragia verdadera en la región lesionada. Por último, a medida que el cerebro



comienza a eliminar el tejido dañado, en el LCR pueden aparecer algunos leucocitos. En resumen, después de una apoplejía que no se acompaña de una hemorragia significativa, es posible encontrar un LCR normal o, más probablemente, un LCR con un nivel proteico elevado, pocos eritrocitos y posiblemente algunos leucocitos.

Isquemia cerebral difusa e hipoxia

Si se produce una interrupción de la totalidad de la circulación cerebral, como ocurre en un paro cardíaco, el paciente sufrirá una pérdida de consciencia a los 6 a 8 segundos. Por otra parte, si el aporte de oxígeno es inadecuado pero la circulación continúa, el resultado clínico consiste en la aparición de mareos seguida de confusión mental en los casos leves y de pérdida de consciencia, convulsiones y coma en los casos de hipoxia moderada a severa. Los hechos desencadenantes incluyen edema pulmonar, intoxicación por monóxido de carbono, embolia pulmonar, estrangulación, insuficiencia respiratoria durante la ventilación mecánica y exposición ambiental a gran altitud. La imposibilidad de restaurar la circulación y oxigenación cerebrales en el transcurso de 4 a 5 minutos después de la interrupción total del flujo puede traer como consecuencia la muerte celular con lesiones irreversibles.

Enfermedades neuromusculares (véase también capítulo 31)

El termino enfermedad neuromuscular se refiere a trastornos que afectan los nervios periféricos, las uniones neuromusculares o las células musculares; típicamente causan debilidad, pérdida sensorial o pérdida de la función autónoma. En este capítulo no se pretende abordar una discusión detallada de este problema, sino enfocarla a los aspectos de laboratorio que auxilian en el diagnóstico.

Los trastornos de los nervios periféricos son tanto hereditarios como adquiridos. El diagnóstico de las neuropatías hereditarias comúnmente requiere una biopsia del nervio para su examen histológico; sin embargo, la neuropatía asociada a la porfiria se asocia frecuentemente con niveles elevados de ácido delta- aminolevulínico y porfobilinogeno en la orina. El síndrome de Guillain-Barré (una polineuropatía desmielinizante idiopática aguda) y su forma crónica originan debilidad muscular y pérdida de los reflejos, presenta un LCR característico con proteínas elevadas sin elevación de la cuenta celular. Otras causas de neuropatía donde el papel del laboratorio es esencial incluyen la diabetes (capítulo 32), hipotiroidismo, vasculitis, uremia (capítulo 26), malfuncionamiento hepático (capítulo 27) y envenenamiento por metales pesados (arsénico, plomo, mercurio y talio). Las causas infecciosas de neuropatía incluyen el SIDA, la enfermedad de Lyme, herpes zoster, difteria y lepra. La neuropatía causada por amiloidosis puede ser secundaria a una discrasia de las células plasmáticas o a una amiloidosis hereditaria.

La miastenia gravis es una alteración de las uniones neuromusculares caracterizada por la presencia de anticuerpos contra el receptor de la acetilcolina. Los pacientes presentan una flacidez fluctuante que típicamente afecta la cara, las extremidades y los movimientos oculares. Aproximadamente el 85% de los pacientes con miastenia activa presentaran títulos de anticuerpos anti-receptor de acetilcolina elevados.

Los trastornos musculares pueden ser hereditarios o adquiridos. Las formas hereditarias de distrofia muscular comúnmente muestran niveles altos de creatina cinasa, aldolasa y lactato deshidrogenasa. En la distrofia muscular de Duchenne y Becker, recientemente se ha encontrado un defecto del gene que codifica para la proteína muscular

llamada distrofina, la cual podría ser un importante examen diagnóstico en estas alteraciones. Las parálisis transitorias constituyen un grupo de enfermedades familiares de origen desconocido, caracterizadas por flacidez muscular y niveles séricos de potasio tanto elevados como disminuidos. La mioglobulinuria ocurre cuando la necrosis muscular es aguda y la mioglobina pasa del músculo a la sangre y se elimina en la orina. Esta alteración puede presentarse en enfermedades musculares hereditarias, convulsiones, traumatismos, procesos isquémicos y trastornos tóxicos o metabólicos. La dermatomiositis y la polimiositis son consideradas miopatías inflamatorias que se asocian con una velocidad de eritrosedimentación aumentada y un incremento de la actividad de creatina cinasa.

Síndromes neoplásicos y paraneoplásicos

Las neoplasias que afectan el SNC se presentan en el tejido neural (cerebro, nervios craneales, medula espinal o nervios periféricos) o en las estructuras relacionadas (cráneo, meninges, vasos sanguíneos, pituitaria o glándula pineal). La meningitis carcinomatosa corresponde a la invasión del LCR y las meninges por células neoplásicas. Si la neoplasia surge directamente de estas estructuras se denomina primaria; mientras que se considera metastásica si ha sido diseminada desde un foco neoplásico en cualquier otro sitio del cuerpo. Los síntomas que se presentan dependen de la naturaleza del tumor, su tamaño y localización. Aproximadamente un tercio de los pacientes con tumores cerebrales desarrollan convulsiones.

Existen neoplasias que desde el exterior del SNC y sin invadirlo directamente producen síndromes paraneoplásicos que alteran la función del sistema nervioso. Los más comunes son los que afectan al cerebelo, los nervios periféricos y las uniones neuromusculares.

Las modernas técnicas de imagenología como la resonancia magnética y la tomografía computarizada pueden identificar las neoplasias del sistema nervioso con extraordinaria exactitud. El diagnóstico de laboratorio, no obstante, continúa siendo útil para ciertas neoplasias. El diagnóstico de la meningitis carcinomatosa se realiza mediante la demostración de células neoplásicas en el LCR. En algunos casos, en el LCR pueden encontrarse también niveles elevados de beta-glucoronidasa y antígeno carcinoembrionario.

Epilepsia

Una crisis convulsiva es un trastorno repentino y transitorio de la función mental o de los movimientos corporales que resulta de una excesiva descarga eléctrica de un grupo de células cerebrales. Existen dos tipos principales de convulsiones: la crisis focal y la crisis generalizada. Los episodios focales inician en áreas discretas del cerebro y se presentan con diversos grados y patrones de difusión. Las crisis generalizadas inician involucrando todo el cerebro a la vez. Las manifestaciones clínicas de las convulsiones dependen de las áreas cerebrales afectadas. Por ejemplo; una crisis focal que afecte la corteza motora puede manifestarse como temblor de una mano, mientras que una que involucre el lóbulo temporal puede originar un estado de inconsciencia con la mirada fija y ausente y la pérdida de la memoria. Los episodios de mirada fija de la crisis generalizada se conocen como ausencias o ataques del pequeño mal ("petit mal"). Tanto las crisis focales como las generalizadas pueden difundirse hasta involucrar todo el cerebro y originar un ataque tónico clónico generalizado conocido como convulsión o ataque del gran mal.

Las crisis focales usualmente son causadas por anomalías localizadas del tejido cerebral que pueden ser identificadas usando procedimientos de imagenología como la



resonancia magnética o la tomografía computarizada. A lgunas causas frecuentes de ataques incluyen la apoplejía, tumores cerebrales, lesiones al nacimiento o traumatismos graves de la cabeza. Las crisis generalizadas pueden ser idiopáticas (sin causa obvia) o sintomáticas como resultado de lesiones masivas del cerebro tales como sobredosis de medicamentos, falla renal, encefalitis o uso de drogas ilícitas. El tipo y la duración del tratamiento dependerán del tipo de ataque y la presunta causa, por ello, cada persona que presenta estas alteraciones necesita una cuidadosa evaluación médica buscando las causas que potencialmente puedan ser corregidas. Los pacientes generalmente se tratan con agentes antiepilépticos por meses o incluso por el resto de sus vidas, con el objeto de que los ataques desaparezcan o al menos se reduzca su frecuencia. Una vez que los pacientes son tratados, generalmente se obtiene un excelente control, permitiéndoles vivir una vida normal y en algunos casos, incluso suspender la terapia después de un cierto período de tratamiento. No obstante, entre un 30 a 40% de los pacientes no logran un control adecuado de las crisis o presentan efectos colaterales de los agentes antiepilépticos.

Intoxicación con fármacos y venenos

Muchas drogas y venenos afectan directamente el sistema nervioso, produciendo confusión, somnolencia, estupor, coma, convulsiones o estados psicóticos. Las drogas también pueden provocar una depresión respiratoria, una alteración del equilibrio metabólico u otros mecanismos indirectos de lesión del sistema nervioso. En muchos casos, el diagnóstico diferencial de estos estados requiere la confirmación bioquímica de la presencia de una droga o tóxico responsable del fenómeno. Cuando se sabe o se sospecha el acceso del paciente a drogas específicas, la búsqueda se ve simplificada.

Los hallazgos físicos pueden orientar hacia un cierto tipo de drogas; por ejemplo, las pupilas cerradas sugieren la intoxicación por opiáceos, mientras que la dilatación amplia de las pupilas sugiere la ingestión de drogas con efectos atropínicos, como los antidepresivos tricíclicos u otras drogas con acción adrenérgica como las anfetaminas. Lamentablemente, muchas situaciones de intoxicación involucran sustancias múltiples, ya sea medicamentos o drogas ilícitas. En estos casos o cuando la circunstancias de la ingestión lo requieren, se utiliza un rastreo toxicológico de las sustancias más comunes.

Enfermedades metabólicas

Existe una variedad de alteraciones metabólicas que pueden afectar el sistema nervioso y que comúnmente se presentan con confusión, estupor o coma. Entre estas se incluye la acidosis respiratoria, hipoglucemia, cetoacidosis, coma hiperosmolar no cetónico, falla hepática, falla renal, diálisis renal y alteraciones electrolíticas. Se presenta encefalopatía anóxica cuando existe un insuficiente aporte de oxígeno al cerebro, causado por fallas en la respiración, en la circulación o en ambas. Una hipoxia moderada puede producir solamente una confusión transitoria, mientras que una hipoxia severa puede causar coma y algunas veces daño permanente del cerebro. La hipercapnia (elevada presión de CO₂ en la sangre) puede producir alteraciones del conocimiento. La hipoglucemia es una causa poco frecuente de sintomatología del SNC a menos que sea severa (glucosa plasmática abajo de 25-30 mg/dL o 1.4-1.7 mmol/L) como ocurre en la sobredosis de insulina, en una severa intoxicación alcohólica aguda o en diversas condiciones pediátricas y neonatales. La hiperglucemia



raramente causa estupor o coma excepto cuando se presenta cetoacidosis o coma hiperosmolar no cetónico (capítulo 32). La falla hepática también puede causar alteraciones de la consciencia debidas al incremento del amonio plasmático. Las alteraciones de la consciencia que se observan en pacientes con insuficiencia renal pueden ser atribuidas a la uremia o al síndrome de desequilibrio asociado con la diálisis. Un gran variedad de trastornos electrolíticos que incluyen (pero no se limitan a) acidosis metabólica, hipernatremia e hiponatremia, hiperkalemia e hipokalemia, pueden dar como resultado alteraciones de la consciencia acompañadas algunas veces de convulsiones.

Enfermedades endocrinas

Enfermedad adrenal.

La liberación inadecuada de cortisol afecta al cerebro de diversas maneras cuya comprensión es incompleta. En los estados crónicos no tratados de hipoadrenalismo, es frecuente observar apatía, depresión, abstinencia e incluso delirios leves. El estupor y el coma usualmente sólo se observan en la agravación brusca de un cuadro crónico, la llamada crisis addisoniana. Otras alteraciones metabólicas secundarias al hipoadrenalismo como hiponatremia, hiperkalemia, hipoglucemia e hipotensión, producen una disfunción adicional del SNC.

El exceso de glucocorticoides y la administración de esteroides se asocian en algunos casos con alteraciones del humor (depresión, manía); confusión leve; delirios, alucinaciones y también con trastornos gruesos de la conducta.

Hipotiroidismo.

En el feto y durante la infancia, el hipotiroidismo puede provocar lesiones cerebrales irreversibles y un profundo retardo mental (cretinismo) a menos que esta condición sea corregida sin demora. El hipotiroidismo crónico se asocia con depresión o humor lábil, falta de atención, confusión y a veces delirios y alucinaciones (capítulo 44). También es posible observar un cuadro de neuropatía periférica y marcha inestable relacionada con un trastorno de las funciones cerebelosas, junto con la aparición de reflejos tendinosos profundos anormales. Por motivos que se desconocen, el hipotiroidismo se acompaña frecuentemente de una elevación de la concentración proteica en el LCR. El hipotiroidismo severo (coma del mixedema) se acompaña por una disminución de la temperatura corporal, reducción de la frecuencia respiratoria e hipometabolismo; estos fenómenos aparecen generalmente en el contexto de un hipotiroidismo crónico exacerbado por algún proceso agudo, como infección, intervención quirúrgica, traumatismo o insuficiencia cardíaca congestiva. Dado que el coma del mixedema es rápidamente fatal, es esencial su diagnóstico correcto y su tratamiento inmediato.

La presencia de signos de hipermetabolismo tiroideo (tirotoxicosis) caracterizan al estado de hipertiroidismo asociado con trastornos de la ideación y la emoción. Como la apariencia clínica de la enfermedad tiroidea puede ser similar a la enfermedad psiquiátrica o los trastornos del SNC, las pruebas de funcionamiento tiroideo frecuentemente se solicitan por las áreas de psiquiatría y emergencia del hospital.



Condiciones Patológicas: Psiquiátricas

Esquizofrenia

Descripción.

Aproximadamente 1% de la población se encuentra afectada por un grupo mixto de alteraciones recurrentes denominadas esquizofrenia, la cual comúnmente inicia entre los adultos jóvenes y persiste a través de toda la vida. El patrón de la esquizofrenia incluye fases activas en las cuales sobresalen pensamientos ilógicos, delirios (fijación de creencias falsas) y alucinaciones auditivas con contenidos frecuentemente amenazantes y comportamiento bizarro. Debido a su tendencia a las recaídas y al declino progresivo de las funciones del paciente, el costo social de la enfermedad es tremendo. En la actual clasificación de los trastornos psiquiátricos (DSM III-R) se describen varios tipos de esquizofrenia, esto es, desorganizada, paranoica, indiferenciada, catatónica y residual.

Fisiopatología.

La causa de esta alteración permanece desconocida, las teorías que intentan explicarla argumentan anomalías del desarrollo y función alterada de los neurotransmisores. Las alucinaciones y delirios parecen estar relacionadas con un incremento en la producción de neurotransmisores en la vía dopaminérgica mesolímbica, mientras que un declino en la vía dopaminérgica mesocortical se asocia con el autismo y la conducta de retiro de los pacientes con esquizofrenia crónica (Davis 1991). Una observación que apoya estos conceptos viene del examen post mortem de un número importante de pacientes con esquizofrenia crónica, en los cuales las neuronas presentan un elevado número de receptores postsinápticos para la dopamina.

Tratamiento.

La medicación antipsicótica mejora y estabiliza los trastornos esquizofrénicos, sin embargo, no proporciona una cura. El mecanismo con el cual estos fármacos actúan se conoce escasamente, pero todos comparten la capacidad de bloquear y antagonizar los receptores dopamínicos en grado variable. Los efectos colaterales más importantes se manifiestan como síndromes extrapiramidales como la distonía; rigidez; una forma extrema del síndrome maligno neuroleptico, que si no se trata puede ser letal; sedación; hipotensión ortostática; boca seca; retención urinaria y constipación causada por el bloqueo adrenérgico y colinérgico.

Trastornos afectivos

Descripción.

Los trastornos afectivos son enfermedades de la regulación del humor, cuyos síntomas clínicos pueden ser depresión, manía o trastorno bipolar (humor que alterna entre depresión y manía). Las manifestaciones del trastorno afectivo van desde la depresión mayor y el trastorno bipolar donde el humor episódico se acompaña de cambios en las funciones neurovegetativas tales como el sueño, apetito y la energía, incluyendo algunos síntomas psicóticos como alucinaciones y delusiones, al trastorno distímico y la ciclotimia en la cual la alteración es menos severa y de mucho tiempo sin los prominentes síntomas neurovegetativos y psicóticos.



La causa de la depresión mayor y los trastornos bipolares se encuentra más relacionada con factores genéticos y biológicos, mientras que la distimia y la ciclotimia son el resultado de eventos vitales y comportamientos de mala adaptación. Los trastornos bipolares parecen tener una relación genética más fuerte que la depresión mayor, debido a que los pacientes bipolares tienen aproximadamente un 30 a 35% mayor probabilidad de que un familiar sea afectado por la enfermedad. En un estudio genético de trastorno bipolar familiar se encontró una mutación en el cromosoma 11, este gene parece estar involucrado en la regulación de la tirosina hidrolasa, la enzima limitante de la síntesis de norepinefrina y dopamina (Kaplan 1988).

Fisiopatología.

Tanto en el pasado como en el presente, se ha hecho un gran esfuerzo en la búsqueda de la alteración de un neurotransmisor como la causa bioquímica subyacente de los trastornos afectivos. Algunos investigadores caracterizan la depresión como relacionada con la serotonina o a la norepinefrina.

La evidencia del papel de la serotonina en la enfermedad depresiva proviene de numerosas informes de disminuidas cantidades de su metabolito, el ácido 5-hidroindolacético (5-HIAA), en el LCR de los pacientes deprimidos; además, el precursor de la serotonina 5-hidroxitriptofano (5-HT), ha demostrado ser un antidepresivo efectivo sólo en pacientes con niveles de 5-HIAA disminuidos en el LCR. No obstante, solo pacientes con un tentativo de suicidio reciente presentan niveles disminuidos de 5-HIAA en el LCR.

La norepinefrina parece ser de una importancia crítica en los trastornos afectivos. La presencia de células con gran contenido de norepinefrina en áreas específicas del cerebro sugiere la posibilidad del papel regulador crítico de la norepinefrina en distintos cambios neurovegetativos que son importantes en la depresión: apetito, función sexual, sueño y consciencia. Los pacientes deprimidos han mostrado tener niveles anormalmente bajos de norepinefrina en el LCR y de 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol (MHFG) urinario, mitad del cual tiene su origen en el metabolismo de la norepinefrina en el SNC. Los pacientes con disminuida excreción urinaria de MHFG a menudo responden a los antidepresivos que inhiben selectivamente la recaptación de la norepinefrina por la neurona presináptica. Como consecuencia de la inhibición de su recaptación, se encuentra disponible más norepinefrina en la hendidura sináptica para actuar sobre el receptor postsináptico, corrigiendo la deficiencia central de norepinefrina.

Tratamiento.

El tratamiento primario de la depresión son los antidepresivos tricíclicos, los cuales se ligan en grado variable a los receptores noradrenérgicos y serotoninérgicos pre y postsinápticos en la hendidura sináptica. El mecanismo de acción de estos fármacos es un bloqueo competitivo de los receptores, haciéndolos inaccesibles a la serotonina y la norepinefrina, lo cual se traduce en una mayor disponibilidad del neurotransmisor. Los fármacos antidepresivos que son relativamente selectivos para la inhibir la recaptación de la norepinefrina incluyen desipramina, protriptilina y maprotilina (ver Tabla 42-2). Agentes farmacológicos que son efectivos en el tratamiento de la depresión, como la amitriptilina, trazodona y fluoxetina inhiben selectivamente la recaptación neuronal del 5-HT de la sinápsis, aunque este no es su único efecto farmacológico. La mayoría de los otros antidepresivos, excepto el bupropión, se cree que actúan aumentando la disponibilidad de estos



neurotransmisores. Por otro lado, los inhibidores de la monoamino oxidasa (MAO) trabajan inhibiendo irreversiblemente la MAO A y B en el citoplasma de la neurona presináptica, inhibiendo así la degradación de norepinefrina, serotonina y dopamina. Esta inhibición toma lugar después de 5-10 días del inicio del tratamiento y origina que mayores cantidades de neurotransmisor sean disponibles para la transmisión neuronal. Además de tratar los episodios depresivos con antidepresivos y los episodios maníacos con sedantes y antipsicóticos, el principal tratamiento de la enfermedad bipolar es el litio el cual tiene propiedades estabilizadoras inespecíficas de la membrana. La carbamazepina y el valproato introducidas originalmente como fármacos antiepilépticos también han mostrado tener algún efecto en la enfermedad bipolar.

Trastornos de ansiedad

Los trastornos de ansiedad tienen como característica central, sentimientos crónicos o paroxísticos de aprehensión que a menudo se acompañan de signos físicos como sudoración, respiración agitada, taquicardia e intranquilidad. La gama de trastornos de ansiedad incluyen la ansiedad generalizada con miedos crónicos, y síntomas físicos; trastornos de pánico con ataques de ansiedad bien circunscrita provocados por situaciones tales como los espacios abiertos o ciertos objetos; y los trastornos obsesivo compulsivos, con profundas o repetidas preocupaciones (obsesiones) y acciones repetidas (compulsiones), ambos fuera del control de la persona.

Las características fisiopatológicas de los trastornos de ansiedad son poco conocidas, aunque existen diversas teorías biológicas, genéticas y de la conducta que tratan de explicarlos. La investigación de los neurotransmisores se ha enfocado en los sistemas noradrenérgicos y GABA-érgicos. Fármacos como las benzodiazepinas incrementan la afinidad del GABA por el complejo receptor.

Tratamiento.

El tratamiento farmacológico de los desordenes de ansiedad generalizada y pánico se realiza con compuestos que afectan el sistema noradrenérgico y que probablemente disminuyen su actividad. Tales fármacos son bloqueadores de los receptores beta-adrenérgicos, antidepresivos tricíclicos, inhibidores de la MAO y benzodiazepinas. Las benzodiazepinas se ligan a receptores específicos a lo largo del cerebro y la medula espinal. Estos sitios de unión están acoplados a un complejo GABA-receptor que media la acción ansiolítica, sedante y antiepiléptica.

El trastorno obsesivo compulsivo, el cual por mucho tiempo se creyó que respondía bien a la psicoterapia, muestra un mejoramiento impresionante a la administración de fármacos como la clomipramina y la fluoxetina, las cuales actúan principalmente sobre la vía de la serotonina y en menor grado sobre la vía de la norepinefrina.

Prueba Funcionales

Prueba de supresión de la dexametasona

El cortisol es la principal hormona corticoesteroide, secretada por las glándulas adrenales en un ritmo circadiano que presenta un pico en las primeras horas de la mañana. La

1730

producción de esta hormona se encuentra regulada mediante la liberación hipofisiaria de ACTH, la cual a su vez se encuentra bajo el control de la hormona liberadora de la corticotropina (HLC) que se produce en el hipotálamo. Bajo condiciones fisiológicas, la producción de cortisol se suprime por la presencia de pequeñas cantidades de corticosteroides exógenos como la dexametasona.

La prueba de supresión de la dexametasona fue originalmente usada para la evaluación del eje hipotalámico-hipofisiario en el síndrome de Cushing (ver pág. 925). Posteriormente se demostró que un subgrupo de pacientes deprimidos que presentaban características de depresión unipolar o psicosis tenían una respuesta anormal a esta prueba. Los pacientes deprimidos con la prueba de supresión de la dexametasona anormal responden mejor a la medicación antidepresiva que aquellos pacientes con una respuesta de supresión de la dexametasona normal. Ulteriormente se ha demostrado que la normalización de la prueba de supresión de la dexametasona después del tratamiento se correlaciona con el grado de respuesta clínica. Por otro lado, la depresión en ausencia de normalización de la prueba se relaciona con el riesgo de una recaída temprana, lo que obliga a suspender la terapia antidepresiva.

Descripción de la prueba.

Alrededor de las 11 p.m. se administra al paciente 1 mg de dexametasona por vía oral y se solicita que se presente al laboratorio a las 8 hs para la determinación del nivel plasmático de cortisol. Niveles plasmáticos de cortisol por arriba de 50 µg/L se consideran anormales y sugieren que el paciente responderá a la terapia antidepresiva. El mejor valor predictivo de esta prueba se encuentra entre los pacientes que sufren depresión unipolar con hallazgos psicóticos o melancólicos. Esta prueba no se usa rutinariamente pero puede ser útil en casos seleccionados.

Cambio de Compuesto Analizado en la Enfermedad (Tabla 42-3)

Aspecto del líquido cefalorraquídeo

El LCR normalmente es transparente como el cristal y sin ninguna pigmentación, es decir, "límpido e incoloro". Debe ser examinado con una luz adecuada contra un fondo blanco, comparándolo con un tubo que contenga agua. Conviene centrar la atención a lo largo del eje longitudinal del tubo y examinar al menos 1 ml de líquido.

Un recuento de glóbulos rojos de 500/(L confiere una pigmentación rosada o amarillenta al LCR. Recuentos leucocitarios de 200/(L generan un aspecto ligeramente turbio. La xantocromía (coloración amarillenta) aparece cuando el LCR se ha contaminado con sangre. Esta pigmentación no aparece inmediatamente sino después de 2 a 4 horas. Cuando la aguja utilizada en la punción lumbar toca algún vaso sanguíneo, la sangre puede entrar en el LCR que será analizado, a esta situación se le conoce como punción traumática. Dado que la presencia de sangre en el LCR puede significar una hemorragia subaracnoidea o simplemente puede ser el resultado de una punción traumática (ocurrencia frecuente), la muestra de LCR debe ser centrifugada de inmediato. Si la centrifugación se lleva a cabo rápidamente, la sangre proveniente de una punción traumática no generará xantocromía. La xantocromía sugiere que la hemorragia ocurrió al menos 2 a 4 horas antes de la observación de la muestra. Puede ser



de utilidad saber que, incluso en casos de hemorragia subaracnoidea, el LCR puede no aparecer xantocrómico hasta que no hayan transcurrido de 2 a 4 horas. Hasta un 10% de los pacientes con hemorragia subaracnoidea, muestran un LCR límpido a las 12 horas pero, una vez transcurrido ese lapso, en un 100% de los pacientes se demuestra xantocromía si la muestra es examinada cuidadosamente. Con técnicas más sensibles como la espectrofotometría del LCR, se puede incrementar la posibilidad de evidenciar niveles discretos de xantocromía.

La presencia de proteínas también confiere un aspecto ligeramente xantocrómico cuando su concentración es superior a los 1500 mg/L. La hemoglobina proveniente de la hemólisis celular sistémica aparece en el LCR solamente después de alrededor de 10 horas. En los pacientes ictericos (es decir, con una bilirrubinemia elevada, como puede ocurrir en la insuficiencia hepática), la bilirrubina puede ingresar al LCR. Sin embargo, para poder observar una xantocromía en el LCR es necesario que los niveles séricos de bilirrubina lleguen a un valor de 100 a 150 mg/litro

Proteínas del líquido cefalorraquídeo

En la enfermedad, la producción local de proteínas o la modificación de las proteínas en el SNC puede conducir a alteraciones del patrón proteico del LCR con utilidad diagnóstica. En general, las enfermedades que alteran la integridad de la barrera capilar endotelial conducen a un incremento de la concentración proteica del LCR. Ejemplo de estas enfermedades son los tumores cerebrales, meningitis purulento (bacteriana), infartos y traumatismos cerebrales.

La inmunoelectroforesis permite un ulterior fraccionamiento de los constituyentes proteicos del LCR. Las principales inmunoglobulinas del LCR están representadas por la IgG, IgA e IgM (con solamente trazas de IgE e IgD). De estas, la IgG es cuantitativamente la más importante. A menudo es de utilidad saber si un valor elevado de IgG es provocado por la producción local de esa proteína en el interior del SNC (como puede ser el caso en algunas enfermedades desmielinizantes como la esclerosis múltiple) o si su presencia en el LCR se debe a su filtración a través de una barrera hematoencefálica alterada (como ocurre en algunas infecciones). Dado que la IgG sérica normal equivale a un 15 a 18% de las proteínas séricas totales y que la IgG normal en el LCR equivale a un 5 a 12%, se emplea la relación proporcional entre la IgG y las proteínas totales para estimar el origen de la elevación de la IgG. Es decir, si esta relación es similar a la habitualmente hallada en el suero, es posible sospechar que la IgG ha sido transferida de algún modo hacia el LCR desde la sangre. Esta estimación es grosera y por ello no es confiable. Un parámetro ampliamente utilizado en la actualidad es el Índice IgG-albúmina. La fórmula para su determinación es la siguiente:

$$\text{Índice de IgG} = \frac{\text{IgG (LCR)} \times \text{Albúmina (sérica)}}{\text{IgG (sérica)} \times \text{Albúmina (LCR)}}$$

El límite de referencia superior para este índice debe ser determinado por cada laboratorio, pero generalmente oscila entre 0.25 y 0.85. El índice de IgG se encuentra elevado en enfermedades en las que existe un incremento de la producción de IgG en el SNC con una



barrera hematoencefálica intacta (como en la esclerosis múltiple). Una disminución del índice de IgG, se presenta cuando existe un compromiso de la barrera hematoencefálica que permite el pasaje de proteínas séricas hacia el LCR (como ocurre en el infarto cerebral, tumores y en algunas formas de meningitis).

El incremento de proteína mielínica básica (PMB) se considera un indicador potencial de desmielinización. La mielina es una sustancia compleja que rodea los axones del SNC formando un forro aislante como el que rodea a los cables eléctricos; esta sustancia es necesaria para la conducción normal de los impulsos eléctricos a lo largo del axón. Las enfermedades desmielinizantes representan un grupo de trastornos en los que la lesión primaria es un proceso que daña la cubierta mielínica de los axones del SNC. La PMB es un constituyente de la mielina normal y se ha encontrado elevada en diversas condiciones que implican lesiones de la cubierta mielínica. Inicialmente se creyó que la elevación de la PMB era específica de la esclerosis múltiple, pero ahora se conoce que se eleva en muchas otras enfermedades del SNC.

Síntesis de gama-globulinas

Las elevaciones de la gama globulina en el SNC pueden ser secundarias a alteraciones de las proteínas séricas, como en el caso de la proteína de Bence-Jones del mieloma múltiple, las cuales son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica y aparecer en la fracción gama de las proteínas del LCR. No obstante, existen evidencias de que la producción local de inmunoglobulinas a nivel del SNC, se presenta en numerosas enfermedades. Algunos ejemplos incluyen la esclerosis múltiple, panencefalitis esclerosante subaguda (un raro y debilitante proceso de lesión mielínica que se presenta en niños y adultos jóvenes), numerosas infecciones agudas y crónicas (neurosífilis, meningitis tuberculosa, abscesos, meningoencefalitis viral y sarcoidosis) y algunos tumores cerebrales. Desde un punto de vista práctico, en los cuadros en los que las proteínas totales del LCR se elevan como resultado de un incremento de permeabilidad de la barrera hematoencefálica, el ingreso de proteínas séricas (la cual normalmente contiene de un 15 a un 18% de gama globulinas) provoca una elevación de la fracción gama del LCR. Por lo tanto se hace difícil la estimación del límite de referencia superior para la gama globulina como porcentaje de las proteínas totales cuando éstas se encuentran significativamente elevadas. En cualquier caso, cuando las gama globulinas del LCR están aumentadas, el clínico puede solicitar una electroforesis simultánea de las proteínas séricas para poder determinar el origen de la elevación de la fracción gama del LCR.

Bandas oligoclonales

La fracción gama del LCR está compuesta por una variedad de proteínas. Con la electroforesis en gel de agarosa de un LCR concentrado se puede demostrar una elevación de las especies proteicas dentro del intervalo gama. Cuando estas proteínas comparten la misma movilidad electroforética se conocen como bandas oligoclonales, las cuales se considera que derivan de pocos clones de células inmunocompetentes. La aparición de las bandas oligoclonales ha sido registrada en un 79 a 90% de pacientes con esclerosis múltiple y en una variedad de otras condiciones inflamatorias del SNC. Es interesante notar que esta alteración de la composición de la fracción gama puede producirse sin que exista un incremento de la concentración total de gama globulina.

Una consideración práctica final acerca de la determinación protéica en el LCR.

Cuando existe sangre en el LCR como consecuencia de una punción traumática o de una hemorragia en el sistema nervioso, es lógico esperar que la sangre determine una elevación de los niveles protéicos en el LCR. En estos casos es aun posible determinar el nivel proteico del LCR a través de una corrección de la cantidad de sangre presente. Simplemente se calculan 10 mg/L de proteínas por cada 1000 glóbulos rojos por mm³. Por ejemplo, si el recuento de glóbulos rojos es de 10,000 en la muestra de LCR y las proteínas totales presentan un nivel de 1000 mg/L, las proteínas totales corregidas equivalen a 900 mg/L. El recuento celular debe ser efectuado tan pronto como sea posible después de la punción lumbar, preferiblemente en la primera media hora y por supuesto antes de 2 horas, dado que después de este tiempo se produce hemólisis.

Glucosa en el líquido cefalorraquídeo (ver los métodos, pág. 635, Capítulo 32)

La determinación de la glucosa en el LCR ayuda a diferenciar entre las meningitis bacterianas y virales; el valor de glucosa a menudo es considerablemente reducido (menos del 40 al 45% de la glucosa sérica analizada simultáneamente) en la meningitis bacteriana, mientras que generalmente es normal en las enfermedades virales. La meningitis carcinomatosa (infiltración diseminada de las meninges por células tumorales) también induce una disminución de la glucosa del LCR por debajo de los valores de referencia.

Pruebas de funcionalidad tiroidea (ver los métodos, pág. 886)

Las enfermedades de la glándula tiroides pueden originar modificaciones del humor que son difíciles de distinguir de la alteración psiquiátrica, por ello la determinación de las hormonas tiroideas forma parte de evaluación diagnóstica que se realiza con los pacientes recién admitidos a los repartos psiquiátricos, para descartar el desequilibrio tiroideo como causa de alteración.

Tamizaje toxicológico (ver los métodos, pág. 1026)

La presencia de drogas o tóxicos, representa una de las causas de comportamiento anormal en el paciente afectado. Así, el rastreo toxicológico en la orina del paciente es una practica que frecuentemente ayuda al medico del la unidad de emergencia para descartar el uso de drogas como causa de psicosis aguda. Usualmente este rastreo se enfoca a la búsqueda de un numero limitado de drogas estimulantes como las anfetaminas, cocaína y fenciclidina. Causas menos frecuentes de una conducta alterada o síntomas neurológicos lo constituyen los envenenamientos por metales pesados. En tal caso se puede solicitar el análisis de plomo en sangre y mercurio en la orina.

3-Metoxi-4-hidroxifenilglicol (MHFG).

La cantidad de MHFG excretada en la orina de 24 horas refleja la actividad noradrenérgica en el cerebro. Una excreción de MHFG menor de 1400 ng en el varón y menor de 1200 ng en la mujer en 24 horas sugiere que la depresión es causada por una deficiencia noradrenérgica (Beckman 1975). De manera que en teoría, los pacientes deprimidos con baja excreción de MHFG responden mejor a antidepresivos del tipo de la desipramina, nortriptilina y protriptilina, los cuales aumentan la disponibilidad de norepinefrina

como neurotransmisor en el cerebro. Sin embargo, en la práctica clínica, el uso de la MHFG urinaria es limitado debido a que el paciente debe evitar la administración de fármacos psicotrópicos por un período de 2 semanas antes de realizar la medición de MHFG.

Ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA).

En el LCR, el 5-HIAA se mide cuando la punción lumbar se realiza en las primeras horas de la mañana. Niveles menores de 15 ng/mL sugieren un trastorno depresivo causado por un déficit de serotonina. Los trastornos depresivos también pueden ser subclasificados de acuerdo al nivel bajo, medio o alto de MHFG (Schildkraut 1982). Si se miden ambos metabolitos, MHFG y 5-HIAA, se forman dos grupos de pacientes: (1) un grupo con bajos niveles de norepinefrina pero metabolitos de la serotonina altos, el cual muestra una respuesta favorable a fármacos que incrementan la actividad noradrenérgica, y (2) un segundo grupo con altos niveles de norepinefrina pero bajo nivel de metabolitos de la serotonina, que muestra una respuesta favorable a fármacos que aumentan la actividad de serotonina (Goodwin 1978). Los niveles urinarios de MHFG y 5-HIAA siguen siendo una herramienta de investigación para identificar las subclases de la depresión y predecir la respuesta al tratamiento pero no son usados rutinariamente en la práctica clínica.

Cambio de Compuesto Analizado en la Enfermedad: Monitoreo de Fármacos Terapéuticos

El monitoreo de las drogas terapéuticas es un elemento esencial para el manejo adecuado de diversas enfermedades neurológicas y psiquiátricas. Cuando la concentración plasmática de un fármaco se conoce, el clínico puede evaluar más fácilmente la eficacia, la toxicidad, las interacciones farmacológicas o el efecto de una sustitución genérica (véase capítulo 56). Un manejo más refinado se logra con el uso de pruebas más avanzadas, como la determinación plasmática del fármaco libre o de sus metabolitos activos.

Fármacos antiepilépticos (véase págs. 605-615 de Pesce AJ, Kaplan LA: Methods in Clinical Chemistry)

Entre los neurólogos, la determinación de las concentraciones plasmáticas de los fármacos antiepilépticos (FAE) representa la prueba de laboratorio probablemente más solicitada. En la Tabla 42-4 se presentan los datos farmacocinéticos de los FAE más comúnmente usados. El rango terapéutico es un concepto importante que solo debe ser usado como una guía general en el manejo del paciente. La meta del tratamiento es el control de los ataques sin efectos colaterales tóxicos, y muchos pacientes logran esta meta con concentraciones plasmáticas de FAE que pueden estar por encima o por debajo del rango terapéutico. Recientes estudios han demostrado que muchos pacientes que toman un solo FAE pueden tolerar concentraciones plasmáticas por arriba del rango terapéutico y obtener un mejoramiento del control de los ataques (Lesser 1984). De este modo, las concentraciones plasmáticas pueden ser de gran utilidad para el clínico, sin embargo, las decisiones acerca del manejo del paciente deben considerar siempre la información combinada acerca del estado clínico del paciente y los datos de concentración en el plasma.



Las concentraciones plasmáticas de FAE deben siempre ser interpretadas con la certeza de que el paciente ha tomado el fármaco por un período suficientemente largo para alcanzar un estado de concentración constante (estado de equilibrio), especialmente con FAE que tienen una vida media prolongada (Tabla 42-4). Esto es aun más importante con la fenitoína, la cual presenta un metabolismo saturable y puede tener una vida media que va de pocos días a varias semanas, dependiendo de la concentración plasmática. Los FAE que tienen una vida media corta (como valproato y carbamazepina) pueden presentar una variación sustancial dependiendo de los picos de concentración. Las concentraciones plasmáticas pueden caer después de las primeras 2 o 3 semanas de tratamiento, debido a la inducción de las enzimas hepáticas que aceleran su metabolismo. Los niveles plasmáticos de FAE que originan toxicidad son generalmente muy cercanos a las concentraciones que se requieren para el control de los ataques; así, se necesitan frecuentes determinaciones de FAE cuando se usan sustituciones genéricas del fármaco.

La medición de los niveles plasmáticos del fármaco libre (no unido a proteínas) es útil cuando el paciente recibe fenitoína o valproato en combinación con otros fármacos, en pacientes con falla renal o hepática o en pacientes con hipoalbuminemia. En estos casos, la concentración del fármaco libre se eleva y produce efectos tóxicos a pesar de que la concentración total permanece sin cambio. En virtud de que los metabolitos activos de primidona, carbamazepina (especialmente carbamazepina 10,11-epóxido), y posiblemente valproato pueden producir toxicidad, la medición de estos metabolitos puede mejorar el manejo de los pacientes en algunos casos.

Medicación antipsicótica

Los antipsicóticos, también conocidos como neurolépticos, son un grupo heterogéneo de fármacos usados para el tratamiento de trastornos psicóticos como la esquizofrenia, depresión, demencia y la agitación inespecífica. También pueden ser útiles en distintos trastornos del movimiento como la Enfermedad de Huntington y el síndrome de Gilles de la Tourette.

Los neurolépticos incluyen compuestos de la clase de las fenotiazinas, que comparten la estructura a tres anillos de la fenotiazina pero difieren en las cadenas laterales (véase Tabla 42-5).

La clozapina es la única dibenzodiazepina usada en los Estados Unidos, los pacientes que la reciben deben controlarse bimestralmente en su recuento de leucocitos.

Otro grupo importante de neurolépticos son los butirofenones tales como el droperidol, haloperidol y pimozide, los cuales tienen estructuras diferentes a las fenotiazinas. Actualmente el haloperidol es el neuroléptico más ampliamente prescrito en los Estados Unidos.

En contraste con los antidepresivos y los antiepilépticos, la respuesta eficaz a la medicación neuroléptica no se encuentra ligada a una determinada concentración del fármaco en la sangre.

Se sugiere que un nivel plasmático de 5 a 20 ng/mL representa la ventana terapéutica para el tratamiento con haloperidol de los síntomas psicóticos y la esquizofrenia. Niveles de haloperidol por encima de 20 ng/mL se relacionan con efectos colaterales como disforia, hipotensión y efectos parkinsonianos (extrapiramidal), los cuales pueden interferir con la respuesta terapéutica.



Medicación antidepresiva

Antidepresivos tricíclicos (véase pp. 667-677 de Pesce AJ, Kaplan LA: *Methods in Clinical Chemistry*).

Además de bloquear la recaptación de la serotonina y la norepinefrina, los antidepresivos tricíclicos inhiben también en grado variable, los receptores alfa-adrenérgicos, muscarínicos e histamínicos, provocando efectos colaterales como hipotensión ortostática, sequedad de boca, constipación y efecto sedante (ver Tabla 42-5).

El rango de dosificación para la mayoría de los antidepresivos tricíclicos generalmente oscila entre 75 a 300 mg/día, dependiendo de la edad, el peso corporal y la función hepática y renal. Una excepción importante la representan nortriptilina y protriptilina, las cuales requieren dosis entre 50 a 150 mg/día. La relación entre niveles plasmáticos de tricíclicos y la respuesta clínica es más clara en los pacientes con depresión mayor, siendo para la mayoría de ellos una curva de tipo sigmoidal (Fig. 42-6). Para la nortriptilina y en menor grado para la protriptilina, esta relación es curvilínea y cuando los niveles plasmáticos están por arriba del rango terapéutico, la respuesta clínica cae dramáticamente y los efectos colaterales son más prominentes.

Inhibidores de la monoamino oxidasa.

Existen dos clases de inhibidores de la monoamino oxidasa: la clase de la hidrazina, que incluye la isocarboxazida y fenelzina, y la clase de los compuestos no hidrazínicos, la cual incluye la tranilcipromina. Los efectos clínicos de estos antidepresivos solo se observan después de 2 a 3 semanas de tratamiento. Los efectos colaterales y las restricciones dietéticas para los pacientes que usan este tipo de fármacos ha limitado su uso. La tiramina, la cual normalmente es metabolizada en el tracto gastroentérico por la monoamino oxidasa A, debe ser eliminada de la dieta, pues en caso de estar presente puede originar una rápida y peligrosa elevación de la presión sanguínea. La tiramina es un compuesto que se encuentra en cantidades importantes en alimentos procesados como la cerveza, el vino el queso y las salchichas. Otros efectos colaterales incluyen hipotensión ortostática, dolor muscular atribuible a la deficiencia de vitamina B6, agitación o insomnio. No existe una relación entre nivel plasmático y tasa de respuesta.

Antidepresivos atípicos

Este grupo incluye la trazodona, un potente inhibidor de la recaptación de la serotonina; el bupropion, un bloqueador de la dopamina; la fluoxetina, que bloquea principalmente la recaptación de la serotonina pero también una cierta cuota de la norepinefrina; y sertralina la cual es inhibidor selectivo de la recaptación de la serotonina. Desde su introducción en el mercado de los Estados Unidos en 1988, la fluoxetina se ha convertido en el antidepresivo más ampliamente prescrito. Estos fármacos difieren de los otros antidepresivos por carecer de una estructura cíclica y tener menos efectos colaterales. La trazodona se distingue por su potencial para producir priapismo, el cual se presenta en uno por cada 10,000 varones tratados y puede requerir tratamiento de emergencia.



Ansiolíticos

Los ansiolíticos son un grupo de medicamentos usados para el tratamiento de los trastornos de ansiedad. En este grupo están incluidas las benzodiazepinas y la bupropión. Todas las benzodiazepinas comparten la misma estructura de tres anillos, pero difieren principalmente en los sustituyentes del anillo heptagonal. Existen tres subgrupos establecidos: (1) las 2-cetobenzodiazepinas que incluyen clordiazepóxido, diazepam y prazepam, las cuales se oxidan en el hígado a desmetildiazepam (metabolito activo) con una vida media de 60 horas, (2) las 3-hidroxibenzodiazepinas (oxazepam, lorazepam y temazepam) metabolizadas en el hígado con una vida media de 9-15 horas, y (3) las triazolobenzodiazepinas (alprazolam y triazolam), metabolizadas en el hígado con 3 a 8 horas de vida media. Los efectos colaterales más comunes incluyen la sedación a bajas dosis, ataxia a altas dosis, y supresión respiratoria a dosis tóxicas. Generalmente se considera que estos fármacos tienen un amplio margen de seguridad y que la sobredosis raramente lleva a desenlaces fatales. Recientemente se ha desarrollado el flumazenil, un antagonista de las benzodiazepinas, que puede ser usado en casos de sobredosis de estos ansiolíticos.

La dosis de las benzodiazepinas difiere ampliamente, desde 6 mg/día para el alprazolam hasta 200 mg/día para clordiazepóxido. A diferencia de los otros medicamentos de uso psiquiátrico discutidos en esta sección, las benzodiazepinas presentan una fuerte potencialidad adictiva que el compuesto utilizado es la bupropión, la cual es un ansiolítico no sedante, no benzodiazepínico. Este fármaco probablemente no actúa directamente sobre el complejo receptorial GABA. Se cree que sus efectos ansiolíticos podrían ser mediados a través de una vía dopaminérgica. La dosis diaria va de 5 a 40 mg. Los efectos colaterales incluyen náusea y dolor de cabeza.

Estabilizadores del humor

En este grupo están incluidos el carbonato de litio, carbamazepina, valproato y clonazepam. En Psiquiatría, el uso terapéutico se orienta al tratamiento del trastorno bipolar, las alteraciones esquizoafectivas, trastornos explosivos y comportamiento inestable relacionado con alteraciones de la personalidad.

En condiciones fisiológicas, los iones de litio son indistinguibles del sodio, remplazándolo a lo largo de la membrana celular. El exacto modo de acción del litio permanece desconocido y en vista de que sustituye al sodio en todo el organismo, sus efectos colaterales pueden involucrar diversos órganos y sistemas. A niveles elevados y tóxicos se han observado efectos neurológicos como temblor, ataxia y sedación, también se ha descrito encefalopatía cuando se administra junto con haloperidol. El tratamiento a largo plazo con litio puede originar hipertiroidismo con bocio no tóxico. Ocasionalmente, también se han visto efectos renales tales como poliuria con polidipsia secundaria, diabetes insípida renal y nefritis intersticial.

El rango de dosificación va de 600 a 2100 mg/día dividida en dos o tres dosis. Los niveles plasmáticos deben ser medidos aproximadamente 12 horas después de la dosis. Niveles plasmáticos de 0.8 a 1.5 mmol/L producen una respuesta terapéutica adecuada en el tratamiento de la manía aguda. Niveles de litio plasmático ligeramente más bajos se recomiendan para la terapia de mantenimiento de los trastornos bipolares y otras condiciones. Los niveles de litio que se pueden obtener y mantener se ven limitados frecuentemente por los efectos subjetivos y el deterioro de la función tiroidea y renal.



La carbamazepina, el valproato y el clonazepan se usan como antiepilépticos, sin embargo recientemente se ha incrementado su uso en psiquiatría para enfermedades como el trastorno bipolar cíclico y los trastornos explosivos. Son usados como alternativa a la terapia con litio, pero recientes estudios sugieren que pueden ser usados como elección de primera línea.

La dosificación y los niveles plasmáticos, particularmente para valproato y carbamazepina son similares a su uso como antiepilépticos.

Los antidepresivos tricíclicos son absorbidos en el tracto intestinal en un grado variable e incompleto. El 75 % se liga a proteínas y la medicación es altamente liposoluble. En el hígado, las aminas terciarias (amitriptilina e imipramina) se desmetilan a aminas secundarias (nortriptilina y desipramina) las cuales representan sus metabolitos activos. La vida media varía entre 10 y 70 horas y puede ser aun más larga para la nortriptilina y la protriptilina. Los niveles plasmáticos en el estado de equilibrio se logran en 5 a 7 días y es posible utilizar una dosis por día.

Los inhibidores de la monoamino oxidasa son absorbidos completamente en el tracto gastrointestinal y son metabolizados en el hígado por acetilación. La vida media es extremadamente variable debido a que más del 50 % de los blancos y más del 70 % de los asiáticos presentan una acetilación lenta. El intervalo de dosificación va de 30 a 50 mg/día para isocarboxazida y tranilcipromina hasta 45 a 90 mg/día para la fenelzina.

La fluoxetina tiene una vida media de 24 a 72 horas y se degrada formando un metabolito desmetilado con una vida media de 7 a 15 días. Trazodona y bupropion presentan una vida media mucho más corta de 8 a 12 horas y a diferencia de otros antidepresivos debe administrarse dos o tres veces al día.

Métodos de Análisis

Barbitúricos

Mark W. Linder

Principios de análisis y uso corriente.

Los barbitúricos son sustancias hipnóticas que actúan como sedantes y analgésicos, pero se usan también para el control de los ataques de epilepsia. El fenobarbital es uno de los miembros de este grupo frecuentemente prescrito para el control de la epilepsia. La cuantificación de este compuesto es probablemente, el análisis más frecuentemente efectuado en el laboratorio clínico para este tipo de fármacos. Adicionalmente a su uso legal en el tratamiento de distintas condiciones clínicas, los barbitúricos son considerados también sustancias de abuso.

La determinación de barbitúricos puede ser realizada tanto por métodos cualitativos como cuantitativos, dependiendo de la condición clínica que se evalúa. Las pruebas cualitativas, típicamente solicitadas en pacientes con sospecha de sobredosis del compuesto, son útiles debido a su rápida ejecución y a su capacidad de reaccionar con cualquier droga de la clase de los barbitúricos. Los análisis cuantitativos de barbitúricos se realizan para establecer los niveles terapéuticos apropiados. Los exámenes cuantitativos utilizan sangre como especimen ya que la concentración sanguínea está estrechamente relacionada con su



efecto farmacológico, mientras que los exámenes cualitativos típicamente usan orina o contenido gástrico como especímenes de elección.

Algunos procedimientos cualitativos para barbitúricos requieren la extracción del compuesto seguida por el análisis mediante técnicas colorimétricas, de espectroscopía ultravioleta o cromatográficas tales como la cromatografía en capa fina (TLC), cromatografía de gases (CG) y cromatografía líquida de alta prestación (HPLC).

Los procedimientos cualitativos más comúnmente usados actualmente son inmunoensayos y métodos cromatográficos tipo TLC y HPLC. El inmunoensayo en orina por técnica TIAE (Tabla 42-6, método 1) representa el procedimiento de rastreo más ampliamente utilizado actualmente para barbitúricos. La técnica TIAE se describe en el capítulo 13. La cantidad de actividad enzimática en la prueba TIAE es directamente proporcional a la cantidad de sustancia presente en el especimen. También se han desarrollado dispositivos desechables que permiten la detección visual de barbitúricos y otras drogas de abuso (Triage, Biosite Diagnostics, San Diego, California).[ref\(1810\)](#) Estos dispositivos utilizan partículas de oro coloidal conjugadas a la droga o drogas interesadas y anticuerpos monoclonales contra estas drogas. La adición del especimen que contiene la(s) droga(s) permite una competencia entre el antígeno presente en la orina y aquel unido a las partículas de oro coloidal por la unión con el anticuerpo. Si un especimen contiene la droga por encima del umbral de concentración del sistema, algunas moléculas de la droga unidas al oro coloidal no serán ligadas por el anticuerpo. Por el contrario, la droga unida al coloide será ligada al anticuerpo en el caso de un especimen sin droga o con pequeñas cantidades de ella. La mezcla de reacción se transfiere a una membrana de nylon con una cantidad adicional de anticuerpos ligados. A través de la membrana pasara entonces, el complejo anticuerpo-oro coloidal de los especímenes sin droga, mientras que solo pasara oro coloidal en los especímenes con la droga. La unión del oro coloidal a la membrana de nylon origina la aparición de una banda de color que corresponde al área que contiene los anticuerpos dirigidos contra la droga en cuestión.

Los procedimientos cromatográficos que usan TLC fueron ampliamente usados para detectar barbitúricos y otras drogas, tanto en suero como en orina. A pesar de que este método es relativamente barato, es muy laborioso y requiere un alto grado de experiencia para su interpretación. La presencia de la droga se determina por las características de migración en la tira cromatográfica, además de sus características de coloración a la luz blanca y ultravioleta después de haberle hecho reaccionar con diversos reactivos (véase pág. 618 de Pesce AJ, Kaplan LA: *Methods in clinical Chemistry*).

El desarrollo de un sistema de HPLC dedicado a la detección de drogas (REMEDI System, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, California) ha permitido que este tipo de separación cromatográfica se realice más fácilmente en el laboratorio clínico (Tabla 42-6, método 2). Puede ser analizados tanto suero como orina con una mínima preparación de la muestra. Desafortunadamente, la sensibilidad del sistema para la detección de barbitúricos en la orina es inaceptable, además de que el sistema se encuentra sujeto a la interferencia y a la incorrecta identificación de las diversas drogas debido a la coelución de algunos componentes.[ref\(1811\)](#)

Las pruebas cuantitativas para barbitúricos típicamente incluyen diversos tipos de inmunoensayo. Estos procedimientos normalmente se emplean para la medición de un barbitúrico específico (como el fenobarbital). Las pruebas cuantitativas actualmente usados incluyen TIAE, fluorescencia polarizada (Tabla 42-6, método 3), inhibición nefelométrica



(Tabla 42-6, método 4), e inhibición turbidimétrica (Tabla 42-6, método 5).

Si el espécimen a analizar contiene una mezcla de barbitúricos, los métodos más adecuados son la cromatografía líquida o de gases o el HPLC, debido a que permiten la separación de los barbitúricos antes de su cuantificación.

Especimen.

Los especímenes para el análisis de barbitúricos incluyen sangre, plasma, suero u orina. Para mantener la estabilidad de los fármacos, es útil refrigerar o congelar las muestras hasta el análisis.

Rango terapéutico.

Las concentraciones terapéuticas para los barbitúricos medidos en suero son las siguientes:

Amobarbital	hasta 8 µg/mL	(< 35 µmol/L)
Butabarbital	hasta 8 µg/mL	(< 34 µmol/L)
Pentobarbital	hasta 4 µg/mL	(< 16 µmol/L)
Fenobarbital	15 a 40 µg/mL	(64 - 172 µmol/L)
Secobarbital	hasta 6 µg/mL	(< 23 µmol/L)

Referencias

1. Wu AHB, Wong SS, Johnson KG, et al: Evaluation of the triage system for emergency drugs-of-abuse testing in urine, *J Anal Toxicol* 17:241-245, 1993.
2. Binder SR, Adams AK, Regalia M, et al: Standardization of multi-wavelength UV detector for liquid chromatography/Nbased toxicological analysis, *J Chromatogr* 550:449-459, 1991.

Bibliografía

- Beckman H, Goodman FK: Antidepressant response to tricyclics and urinary MHPG in unipolar patients, *Arch Gen Psychiatry* 32:17-21, 1975.
- Davis K, Kahn R, Ko G, Davidson M: Dopamine in schizophrenia, *Am J Psychiatry* 148:1474-1486, 1991.
- Fishman RA: *Cerebrospinal fluid in diseases of the nervous system*, Philadelphia, 1980, Saunders.
- Garvey M, Rubeis R, Hollon S, et al: Response of depression to very high plasma levels of imipramine plus desipramine, *Biol Psychiatry* 30:57-62, 1991.
- Goodwin FK, Cowdry RW, Webster MH: Predictors of drug response in the affective disorders. In Lipton MA, Maschio A, Killam KF, editors: *Psychopharmacology: a generation of progress*, New York, 1978, Raven Press.
- Kaplan H, Sadock B: *Clinical psychiatry*, Baltimore, 1988, Williams & Wilkins.
- Lesser RP, Pippenger CE, Lueders H, Dinner DS: High-dose monotherapy in treatment of intractable seizures, *Neurology* 34:707-711, 1984.
- Pesce AJ, Kaplan LA: *Methods in clinical chemistry*, St. Louis, 1987, Mosby.
- Peter JG: *Use and interpretation of tests in neuroimmunology*, Santa Monica, Calif., 1991, Specialty Laboratories.
- Plum F, Posner JB: *The diagnosis of stupor and coma*, ed 3, Philadelphia, 1980, FA Davis.
- Rowland LP, editor: *Merritt's textbook of neurology*, ed 8, Philadelphia,



1989, Lea & Febiger.

Schildkraut JJ, Orsulak PJ, Schatzberg AF, et al: Biochemical discrimination of subgroups of depressive disorders based on differences in catecholamine metabolism. In Usdin E, Hanin I, editors: *Biological markers in psychiatry and neurology*, New York, 1982, Pergamon Press.

van Putten T, Marder S, Mintz J, Poland R: Haloperidol plasma levels and clinical response, *Am J Psychiatry* 149:500-505, 1992.

Tablas

Tabla 42-1. Causas de coma y estados de alteración mental

Tipo	Causa	Hallazgos de Laboratorio
Metabólico	Alcoholismo	Incremento del etanol en sangre, acidosis metabólica y cetosis
	Coma hiperosmolar	Glicemia > 500 mg/dL, cetosis, deshidratación
	Cetoacidosis diabética	Aumento de la glucemia, cetosis, acidosis, deshidratación
	Acidosis metabólica de otro origen	Descenso del pH, aumento del ácido láctico
	Hipoglucemia	Descenso de la glucemia (< 50 mg/dL)
	Hipercalcemia o hipocalcemia	Alteración de los niveles de calcio; en la hipocalcemia puede observarse hipomagnesemia.
	Fármacos	Presencia de altos niveles de diversos fármacos y drogas en suero o en el tamizaje toxicológico de la orina.
Enfermedades metabólicas sistémicas	Coma hepático	Aumento del amoníaco en sangre; incremento de las pruebas de función hepática.
	Coma urémico	Incremento de la uremia y la creatininemia con acidosis metabólica
	Isquemia cardíaca o pulmonar	Acidosis láctica
	Hipotiroidismo o hipertiroidismo	Alteración de las pruebas de función tiroidea
Encefalopatía	Hemorragia intracraneal	LCR sanguinolento
Traumatismo	—	Ninguno o LCR sanguinolento si se presenta una hemorragia traumática

Infecioso	Bacteriana, viral	Disminución de la glicorraquia; incremento de las proteínas del LCR
Psiquiátrico	—	Ninguno

Tabla 42-2. Sitio de acción de algunos antidepresivos

	Bloqueo de la recaptación		Bloqueo del receptor		
	NE	5-HT	Ach Muscarínico	H ₁	H ₂
Imipramina	+	+	++	±	±
Desipramina	+++	±	±	-	-
Trimipramina	±	±	++	++	?
Amitriptilina	±	++	+++	++	++
Nortriptilina	++	±	+	±	±
Protriptilina	+++	±	+	+++	-
Amoxapina	++	±	+	±	?
Doxepina	+	±	++	+++	+
Maprotilina	+++	-	+	±	?

De: Kaplan H, Sadock B: Clinical psychiatry, Baltimore, 1988, Williams & Wilkins.
Ach = Acetilcolina; H = histamina; 5-HT = 5-hidroxitriptofano; NE = norepinefrina.

Tabla 42-3. Alteraciones bioquímicas en las enfermedades del sistema nervioso central

Enfermedad	Alteración del LCR					
	Glucosa	Proteína total	IgG	Índice de IgG	Xantocromía	Ácido láctico
Apoplejía (Infarto cerebral)	N	↑	N	↓	N, ↑	N, ↑
Hemorragia	N	↑↑	N	N	↑↑	N
Epilepsia	N	N	N	N	N	N
Tumor del SNC	N, ↓	↑	N, ↑	↓	N, ↑	N, ↑
Infección						
Micótica,						
bacteriana	↓	↑	↑	↑	N	↑
Viral	N	N	↑	↑	N	N

Coma	↑↑ hiperosmolar hipoglucemia	↑(trauma)	N	N	N, ↑(trauma)	N
Meningitis, viral	N	N, ↑	N, ↑	↑	N	N
N, poco o ningún cambio; ↑, aumento; ↑↑, gran aumento; ↓, descenso.						

Tabla 42-4. Fármacos antiepilépticos usados comúnmente.

Fármaco antiepiléptico	Nombre comercial común	Rango terapéutico "recomendado" (µg/mL)*	Tiempo aproximado para llegar al "estado estacionario" (días)	Otras características
Fenitoína	Dilantin	10-20	3-21**	Elevada unión a proteínas
Carbamazepina	Tegretol	4-12	3-5	Metabolito activo
Primidona	Mysoline	5-12	1-2	Metabolito activo
Fenobarbital	-	10-40	15-25	-
Valproato /divalproex50-10	Depakene /Depakote	50 - 100	2-5	Metabolitos activos; unión a proteínas saturable.
Etosuximida	Zarontin	40-100	7-13	-
Clonazepam	Klonopin	13-72 (ng/mL)	4 - 8	-
Felbamato	Felbatol	No definido	4-5	Actúa como inhibidor enzimático hepático, aumentando las concentraciones de otros antiepilépticos; asociado con anemia aplásica.
Gabapentin	Neurontin	No definido	1-2	Eliminación renal; no metabolizable.
* Ver el texto.				
** Presenta un metabolismo saturable en modo que el tiempo al "estado estacionario" aumenta cuando la concentración plasmática aumenta.				

Tabla 42-5. Fármacos antidepresivos comúnmente usados

Fármaco antidepresivo	Nombre comercial común	Nivel plasmático Terapéutico (µg/mL)	Vida media (horas)	Otras características
-----------------------	------------------------	--------------------------------------	--------------------	-----------------------

Antidepresivos tricíclicos				
Amitriptilina	Elavil	150-500*	24	Altamente anticolinérgico
Nortriptilina	Pamelor	50-150	24	
Doxepina	Sinequan	150-500	24	Altamente antihistamínico
Imipramina	Tofranil	150-500**	24	
Desipramina	Norpramin	150-500	24	Baja actividad anticolinérgica
Amoxapina	Asendin	150-250	24	Loxapina (metabolito neuroléptico)
Inhibidores de la Monoamino oxidasa				
Isocarboxazida	Marplan	N/A	8-10	
Fenelzina	Nardil	N/A	8-10	
Tranilcipromina	Parnate	N/A	8-10	Efecto estimulante
Antidepresivos atípicos				
Trazodona	Desyrel	N/A	8-10	Priapismo potencial
Fluoxetina	Prozac	N/A	48-72	Metabolito con larga vida media
Sertralina	Zoloft	N/A	-	
* Incluye amitriptilina y su metabolito nortriptilina.				
** Incluye imipramina y su metabolito desipramina.				

Tabla 42-6. Métodos para el análisis de barbituratos

Método	Principio	Uso	Comentarios
1. TIAE (Técnica de Inmunoensayo Amplificado Enzimáticamente)	Un anticuerpo compete por el fármaco libre y marcado con la enzima. La unión del anticuerpo al fármaco marcado provoca una pérdida de la actividad funcional de la enzima. La pérdida de actividad enzimática se monitorea mediante la disminución del producto de la reacción (p.ej. NADH).	Suero, orina.	Ampliamente usado Procedimiento cualitativo y cuantitativo

2. HPLC (Cromatografía de Líquidos de Alta Eficacia)	Los barbitúricos se identifican mediante el tiempo de retención y las características de absorción en el UV.	Sangre, plasma, suero, orina, contenido gástrico.	Procedimiento cualitativo y cuantitativo. Puede ser usado para cuantificar diversos fármacos antiepilépticos simultáneamente.
3. IPF (Inmunoensayo de Polarización de Fluorescencia)	Competencia del fármaco libre y marcado por el anticuerpo. El fármaco marcado ligado al anticuerpo presenta mayor fluorescencia polarizada que cuando no ha sido ligado. La cantidad de fluorescencia polarizada es inversamente proporcional a la concentración del fármaco en el espécimen.	Suero, plasma	Frecuentemente usado Método preciso
4. Inhibición Nefelométrica	Inhibición competitiva de la precipitación	Suero	Requiere instrumentación especializada
5. Inhibición Turbidimétrica	Inhibición competitiva de la formación de agregados insolubles de partículas anticuerpo-fenobarbital. El grado de agregación de las partículas es inversamente proporcional a la concentración de fenobarbital.	Suero, plasma	

Figuras

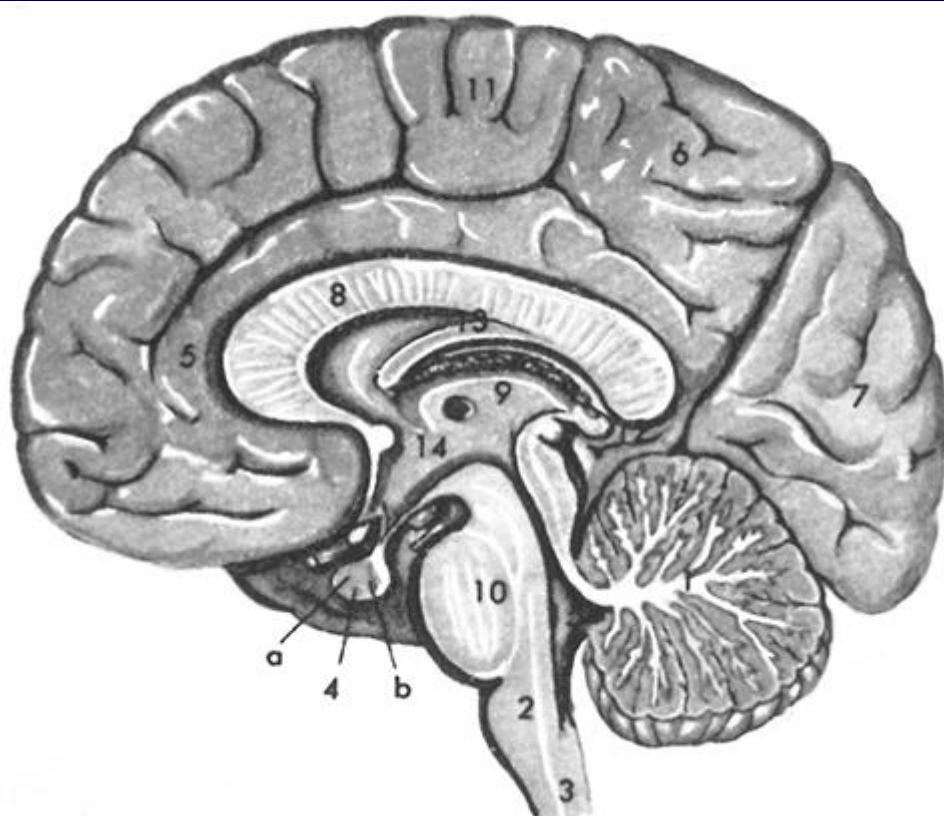


Figura 42-1 Esquema de las áreas funcionales o de control motor del cerebro (hemisferio derecho, vista medial). 1, Cerebelo; 2, medula oblonga; 3, medula espinal; 4, glándula pituitaria: a, lóbulo anterior, b, lóbulo posterior; 5, lóbulo frontal; 6, lóbulo parietal; 7, lóbulo occipital; 8, cuerpo calloso; 9, tálamo; 10, bulbo raquídeo; 11, cerebro; 12, cuerpo pineal; 13, fornix; 14, tercer ventrículo; 15, cuarto ventrículo. (De Beck, EW: *Mosby's atlas of functional human anatomy*, St. Louis, 1982, Mosby.)

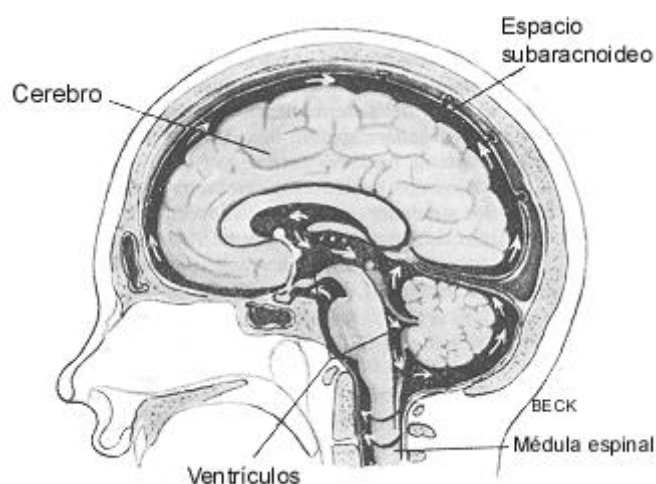


Figura 42-2 Esquema del cerebro en el que se observan las relaciones de los ventrículos

y el espacio subaracnoideo con el resto del cerebro. (De Beck, EW: *Mosby's atlas of functional human anatomy*, St. Louis, 1982, Mosby.)

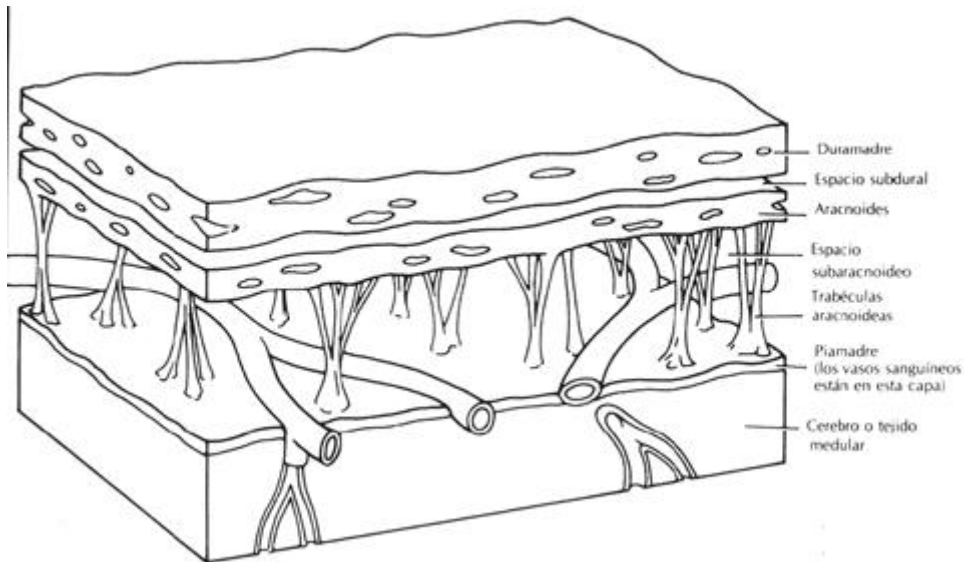


Figura 42-3 Esquema de las meninges. Su disposición puede ser comparada con un estacionamiento subterráneo. La dura y la aracnoides corresponden al techo y la piamadre representa el piso. El LCR circula en el espacio subaracnoideo. (De Prezbindowski KS: *Guide to learning anatomy and physiology*, St. Louis, 1982, Mosby.)

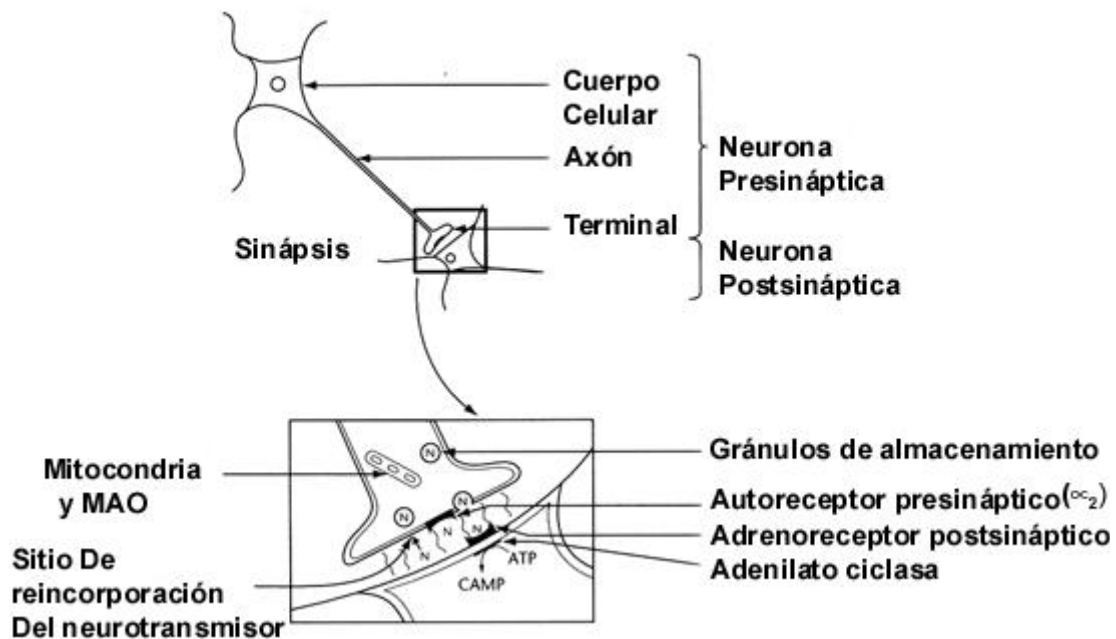


Figura 42-4 Neurona norepinefrínica, sinápsis y conexiones postsinápticas.

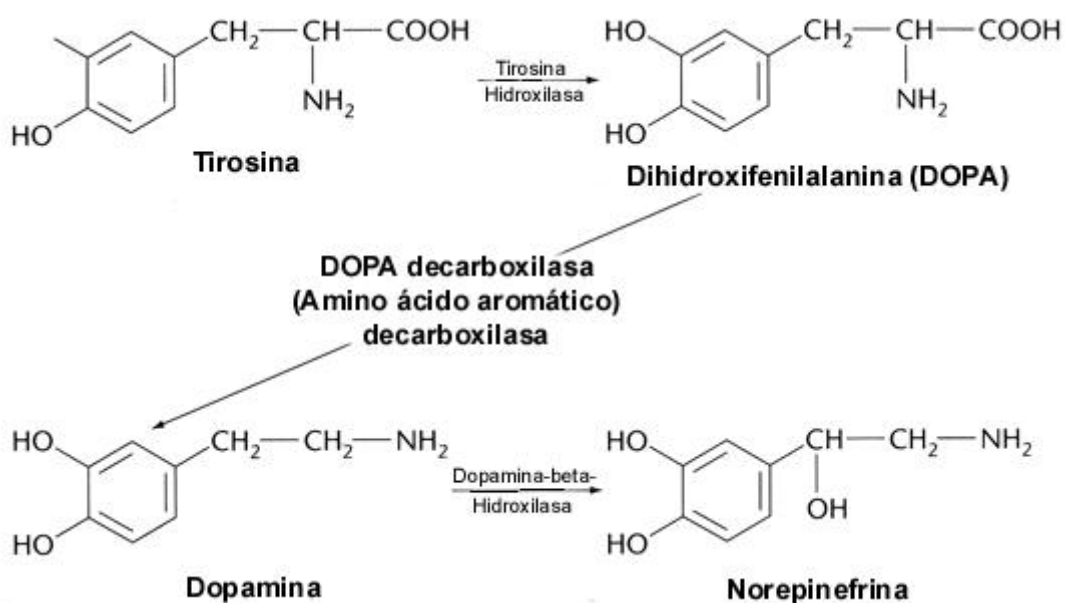


Figura 42-5 Vía enzimática para la síntesis de dopamina y norepinefrina. (De Kaplan H, Sadock B: *Clinical psychiatry*, Baltimore, 1988, Williams & Wilkins.)

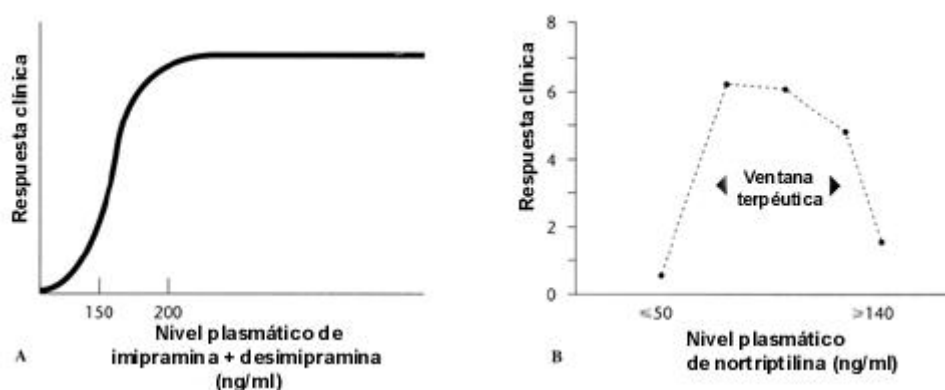
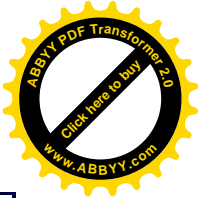


Figura 42-6 A, Relaciones sigmoidales entre la respuesta clínica y los niveles de plasmáticos de desimipramina más imipramina. B, Relación curvilínea entre la respuesta clínica y los niveles plasmáticos de nortriptilina. (De: Schatzberg AF, Cole JO: *Manual of clinical psychopharmacology*, Washington, D.C., 1986, American Psychiatric Press.)

CAPÍTULO 43



43. Endocrinología General

Laurence M. Demers

Fundamentos de endocrinología

- Naturaleza química de las hormonas
- Mecanismos de acción de las hormonas
 - Hormonas esteroideas
 - Hormonas peptídicas
- Control regulatorio de la síntesis y liberación hormonal
 - Mecanismos de retroalimentación
 - Control de disponibilidad de las hormonas
- Transporte de hormonas libres y ligadas a proteínas
- Acción de las hormonas locales y de factores de crecimiento

Eje hipotálamo-hipofisiario

- Hipotálamo
- Neurohipófisis
- Adenohipófisis

Condiciones patológicas

- Deficiencia de hormonas pituitarias
- Exceso de hormonas pituitarias

Pruebas de función hipotalámica y pituitaria

- Exceso de ACTH
- Deficiencia de GH
- Hipogonadismo secundario

Cambio del compuesto analizado en la enfermedad

- Prolactina
- ACTH
- Hormona de crecimiento
- TSH
- FSH/LH

OBJETIVOS

- ♦ Describir el mecanismo de acción de las hormonas esteroideas y peptídicas.
- ♦ Describir el control en la biosíntesis de la hormona y su liberación.
- ♦ Enumerar los factores hipotalámicos y su control en las hormonas pituitarias.
- ♦ Describir las condiciones patológicas de la pituitaria, (deficiencia y exceso).
- ♦ Enumerar las principales hormonas que proporcionan una valoración de



función pituitaria.

Términos Clave

acromegalia Condición patológica en adultos que esta asociada con hipersecreción de hormona de crecimiento.

adenohipófisis Lóbulo anterior de la glándula pituitaria que secreta hormonas tróficas.

adenoma pituitario Un tumor de la pituitaria que produce cantidades excesivas de una hormona particular.

amenorrea Ausencia del ciclo y período menstrual.

circulación portal pituitaria Canal vascular que conecta el hipotálamo con la hipófisis anterior.

citoquinas Péptidos sintetizados y liberados por los leucocitos y los macrófagos tisulares que estimulan o suprimen la actividad funcional de los linfocitos, monocitos, neutrófilos, fibroblastos, y células endoteliales.

diabetes insípida Estado patológico asociado con secreción disminuida de hormona antidiurética y eliminación excesiva de agua.

esteroides Hormonas producidas por glándulas endocrinas a partir del colesterol, que tienen como estructura básica el núcleo del ciclopentanofenantreno.

factor autocrino Factor celular que actúa recíprocamente con receptores que se encuentran en la misma célula.

factor intracrino Factor del citosol producido por una célula, que viaja hacia el núcleo y se une a un receptor específico en el DNA para regular la actividad del gen.

factores liberadores Péptidos sintetizados por el hipotálamo y liberados en la circulación portal para intervenir en la síntesis y secreción de las hormonas pituitarias.

factor paracrino Factor liberado por una célula que se une a los receptores de otra célula en el mismo tejido.

factor yuxtacrino Factor de crecimiento ligado a la membrana que interactúa con el receptor de la membrana de una célula vecina por contacto directo de célula a célula.

galactorrea Secreción incontrolada de leche por la glándula mamaria.

glándula endocrina Glándula especializada que libera hormonas a la circulación que afectan un tejido u órgano específico a distancia

hipotálamo Porción del cerebro que regula funciones endocrinas y neurotransmisoras

hormona Sustancia química liberada por una glándula endocrina a la circulación.

hormona biodisponible Hormona que circula, libre o débilmente ligada



a proteínas del plasma que está disponible para ser captada por la célula y ligarse al receptor del tejido.

hormonas peptídicas Hormonas sintetizadas por glándulas endocrinas especializadas y compuestas de aminoácidos; que son liberadas a la circulación para interactuar con los receptores de membrana de otros tejidos y órganos

liberación pulsátil Liberación de hormonas hipotalámicas o hipofisiarias en pulsos cortos, durante las 24 horas del día. La amplitud y frecuencia del pulso son únicas para cada hormona.

neurohipófisis Parte posterior de la glándula pituitaria que es una extensión del sistema nervioso central.

proteína -G Proteína reguladora encontrada en la membrana de las células de los mamíferos que actúa transmitiendo una señal hormonal extracelular a factores internos de membrana como parte de un sistema de transducción célula-membrana.

receptor Proteínas específicas del citosol y de la membrana que se unen a una hormona o factor de crecimiento con especificidad y afinidad alta.

retroalimentación Mecanismo que integra dos glándulas endocrinas el cual mantiene los niveles de hormonas circulantes dentro de límites fisiológicos por medio de una señal positiva o negativa.

transporte hormonal Mecanismo por el cual se transportan las hormonas en la circulación sanguínea, ligadas a proteínas transportadoras.

Fundamentos de Endocrinología

El sistema endocrino comprende parte de la red de comunicación extracelular dentro del organismo que une el cerebro a ciertos órganos y tiene funciones en el control del metabolismo corporal, crecimiento, desarrollo, y reproducción. Los otros dos componentes principales de la red de comunicación, el sistema nervioso central y el sistema inmune, están también unidos al sistema endocrino como parte del control de la función corporal. El sistema endocrino funciona a través de una red complicada de mensajeros químicos llamados hormonas producidas por órganos endocrinos altamente especializados. La localización de las glándulas endocrinas se muestra en la Fig. 43-1. Las hormonas entran en la circulación para ejercer su acción en un sitio usualmente distante de donde han sido producidas; interactúan con receptores específicos en las células blanco, confiriéndole selectividad a su acción. La definición tradicional de endocrinología, que es el estudio de la acción hormonal distante del sitio de su producción, ha sido revaluada en los últimos años, debido a que ahora se reconoce la importancia de los efectos locales del metabolismo y acción hormonal dentro de una determinada glándula o tejido endocrino. Además, muchos factores de crecimiento producidos localmente por células específicas realizan una comunicación celular similar a la interacción con el receptor hormonal. Muchos de los efectos biológicos de las hormonas son producidos en el órgano blanco a través del metabolismo de hormonas precursoras. Como ejemplos de síntesis hormonal en células blanco se pueden mencionar la biosíntesis de estrógenos a partir



de precursores esteroideos como la androstenediona y la formación de triyodotironina partiendo de T₄.

El control del sistema endocrino es afectado por su unión al sistema nervioso central a través del hipotálamo y la glándula pituitaria. Esta relación con el sistema endocrino es conocida como sistema neuroendocrino e implica una interacción entre químicos neurosecretores producidos en el cerebro y factores hormonales sintetizados por los principales órganos endocrinos localizados en el cerebro. Es evidente que el sistema inmune también actúa en los centros nerviosos del cerebro facilitando la orquestación de los mensajes hormonales, positivos y negativos, por la elaboración de citoquinas producidas tanto por los tejidos endocrinos como por células inmunocompetentes localizadas en el cerebro.

Naturaleza química de las hormonas

Las hormonas están divididas básicamente en dos grupos, peptídicas y esteroideas. La mayoría de las hormonas están formadas por aminoácidos y péptidos, y varían desde moléculas glicopéptidas complejas como la gonadotropina coriónica humana a moléculas simples de aminoácidos como las catecolaminas. Los esteroideos son derivados del colesterol y se subdividen en dos grupos, los que contienen un núcleo intacto del ciclopentanofenantreno, como los esteroideos adrenales y gonadales, y aquéllos como la vitamina D que tiene una alteración en el anillo B del núcleo básico del fenantreno. La estructura química de la hormona le confiere la capacidad de interactuar con receptores específicos de tejido y realizar su acción hormonal. Por ejemplo, la ausencia de un grupo metilo entre el anillo A y B de la molécula esteroidea unida a un anillo A saturado determina la diferencia entre las hormonas esteroideas femenina, estradiol y la masculina, testosterona. Esta diferencia química sutil y la presencia de receptores proteicos específicos en el tejido permiten a la hormona reconocer un tejido u órgano en particular para producir sus efectos biológicos. La lista de las principales hormonas peptídicas, esteroideas y sus sitios primarios de acción se muestran en la Tabla 43-1.

Mecanismos de acción hormonal

Todas las hormonas actúan en sus respectivas glándulas y tejidos blancos a través de proteínas de unión específicas, llamadas receptores que están localizados tanto en la superficie de la membrana como dentro del citosol de la célula blanco. La unión de la hormona a su receptor específico es la primera señal de contacto con la célula. Posteriormente sigue una amplificación de esta señal involucrando muchas señales mensajeras intermedias. Estas señales actúan finalmente en el núcleo de la célula blanco para producir una alteración en la expresión del gen, conduciendo a la síntesis de mRNA y por lo tanto a la formación de una nueva proteína. Figura 43-2 y 43-3 muestran ejemplos de los mecanismos de unión y acción hormonal, tal como se están entendiendo actualmente.

Hormonas esteroideas.

Todas las hormonas esteroideas interactúan con sus células blanco uniéndose a receptores proteicos específicos localizados tanto en el citoplasma como en el núcleo de las células (Fig. 43-2). Cada tejido sensible a los esteroideos tiene una concentración finita de

receptor proteico con una constante de afinidad que es mayor que la de otros enlazantes de las hormonas esteroideas, tales como las proteínas transportadoras. Las proteínas transportadoras que se encuentra en la circulación, llevan esteroides desde el órgano donde son sintetizados hacia el órgano o tejido blanco. La mayor afinidad del receptor proteico le permite al tejido, secuestrar el esteroide específico de la proteína transportadora específica para la hormona, puesto que el tejido está perfundido con sangre que contiene el esteroide circulante. Los esteroides penetran en la célula principalmente por difusión, se unen a la molécula del receptor y producen un cambio conformacional en la estructura del mismo. El resultado es la formación de un complejo transformado receptor- esteroide activado. Este complejo tiene una alta afinidad por los sitios de unión en la cromatina nuclear y se une a las secuencias del DNA tanto regulatorios como no regulatorios en el extremo 5' del gen sensible. La unión del complejo transformado receptor-esteroide a los elementos regulatorios del gen produce una activación del mismo y como consecuencia la síntesis de proteínas específicas. El resultado obtenido es la alteración del metabolismo que puede llevar a una diferenciación y crecimiento celular, y la secreción de productos celulares específicos. Todas las hormonas esteroideas interactúan con sus complejos receptores de manera similar. Como ejemplo, la interacción es la misma para el complejo cortisol-activado como la de los estrógenos que actúan en el crecimiento de la célula uterina. Aunque se habla de receptores del citosol para los esteroides, es importante tener en cuenta que la hormona tiroidea también ejerce su efecto biológico a través de un complejo citosol-receptor con translocación del complejo al núcleo de una manera similar al de las hormonas esteroideas.

En ciertas circunstancias, la medida de los niveles de receptores esteroideos en los tejidos se utiliza en el seguimiento y tratamiento de algunas enfermedades malignas. En el caso de cáncer de seno, los niveles de receptores tisulares de estrógenos y progesterona son de utilidad en el pronóstico y permiten clasificar el subtipo de cáncer. El tejido normal del seno contiene muy pequeñas cantidades de proteínas receptoras de estrógenos y progesterona. Ciertas formas de cáncer de seno presentan un incremento en el nivel de las proteínas receptoras de los esteroides en el tejido. Por lo anterior estos cánceres de seno se denominan hormona dependientes. En consecuencia los pacientes requieren una modalidad de terapia antihormonal, como alternativa a la quimioterapia. Esta terapia se basa en el uso de drogas que inhiben tanto la unión del estrógeno a su receptor como la biosíntesis de hormonas estrogénicas. De esta manera la determinación de los niveles de receptores proteicos esteroideos en el tejido han demostrado ser una herramienta clínica importante que clasifica el subtipo de cáncer de seno hormona dependiente y ayuda a seleccionar la terapia antihormonal apropiada para estos pacientes.

Hormonas peptídicas.

Las hormonas peptídicas interactúan con receptores de la membrana celular, en contraste con las hormonas esteroideas y del tiroides que se ligan al receptor citoplasmático. El receptor comprende tres áreas, o dominios - un dominio extracelular de unión a la hormona, un dominio de transporte a través de la membrana, y un dominio intracelular para las cinasas. El mecanismo de receptor localizado en la membrana de la célula parece ser más complejo que el del receptor localizado en el citosol. El mecanismo de señalización implicado en la interacción receptor-hormona peptídica incluye una cascada de eventos postreceptor que involucra muchos efectores como los nucleótidos cíclicos, metabolitos del ácido

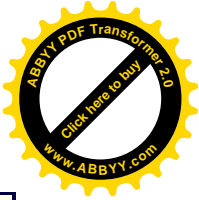
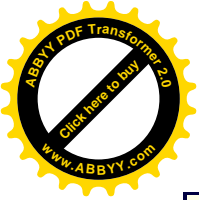
araquidónico, proteínas-G, y fosfolípidos de inositol. Estos intermediarios actúan como mensajeros secundarios que transmiten la señal de la interacción inicial del receptor-hormona a otras áreas de la célula. En muchos casos, cuando la hormona se une al dominio extracelular del receptor de membrana, se activa una señal intermedia que se traduce en un evento intracelular. Este transductor de la señal unido a la membrana es con frecuencia una proteína regulatoria enlazante de nucleótidos de guanina (Proteína-G). La proteína-G se acopla a las enzimas adenil ciclasa y fosfolipasa que activan las proteínas cinasas intracelulares para transmitir la respuesta biológica. Algunos sistemas de receptores contienen el efector como parte de su estructura intrínseca. La mayoría de los factores de crecimiento semejantes a la insulina, como el factor de crecimiento parecido a la insulina y el factor de crecimiento epidermal, interactúan con un receptor de la superficie celular que tiene actividad de la enzima tiroxina cinasa en su dominio intracelular. Un ejemplo del complejo proteína-G-receptor de membrana y la cascada de activación por una hormona peptídica se muestra en Fig. 43-3.

Control regulatorio de la síntesis y liberación hormonal **Mecanismos de retroalimentación.**

Un rasgo característico del sistema endocrino es su habilidad para autorregularse por medio de estímulos negativos o positivos a cada glándula que produzca una hormona secretoria. Toda secreción hormonal esta controlada por alguna forma de retroalimentación. Un sistema de "retroalimentación" requiere dos unidades de producción en las que el producto de una unidad afecta la producción de la otra directamente. Los productos componen las dos mitades de un ciclo. El producto de una unidad normalmente aumenta la actividad de la segunda. El resultante de la segunda unidad "retroalimenta" a la unidad original para controlar su secreción. A menudo, la retroalimentación es negativa; es decir, el producto de la segunda unidad causa una disminución en la producción de la primera, lo cual conlleva a una estimulación disminuida de la segunda unidad. Bajo condiciones fisiológicas normales, el efecto global de la retroalimentación en el sistema endocrino es el mantenimiento de los niveles relativamente constantes de hormonas circulantes.

El mecanismo de retroalimentación del eje hipotálamo-pituitario es el más conocido; sin embargo, se han estudiado otros, por ejemplo, el del control del calcio sobre la glándula paratiroides para reducir la secreción de PTH, y el de la glucosa a nivel del páncreas en la secreción de insulina. Al estudiar el mecanismo de retroalimentación endocrina, sin embargo, el paradigma normalmente es la interacción del eje hipotálamo-pituitario-glándula endocrina (Fig. 43-4). La secreción de las glándulas blanco, como la tiroides, las suprarrenales, o las gónadas, es regulada principalmente por retroalimentación negativa del eje hipotálamo-pituitario, el cual mantiene el control del sistema nervioso central (SNC) sobre los niveles circulantes de cada una de las hormonas. Cuando la cantidad de la hormona circulante disminuye, el hipotálamo rápidamente lo percibe y aumenta la producción de los factores liberadores que entran en la circulación portal del cerebro para estimular la síntesis y secreción de la glándula pituitaria y restablecer los niveles hormonales normales. Este estímulo se denomina retroalimentación positiva. De la misma manera, cuando los niveles de la hormona son excesivos, se reduce la síntesis de los factores liberadores y de la secreción de la glándula pituitaria, lo cual redundo en una disminución de los niveles hormonales.

La retroalimentación negativa predomina en la endocrinología, aunque la positiva también es importante. Un ejemplo de retroalimentación positiva es la retroalimentación



ovárica – hipofisiario de los estrógenos que ocurre en la mitad del ciclo menstrual, en el cual el estradiol estimula súbitamente la liberación de gonadotropinas por parte de la pituitaria. Cada órgano blanco controla sus propias velocidades de síntesis y utiliza el mecanismo de retroalimentación cuando es necesario aumentar la síntesis de la hormona, a través de la atenuación de la retroalimentación negativa, que disminuye las secreciones hipotalámicas - hipofisiarias. Algunos ejemplos de la retroalimentación e interacción del órgano endocrino primario con el eje hipotálamo-hipofisiario se muestran en las Figs. 43-5 a 43-9.

Las hormonas hipotalámicas y pituitarias se secretan en patrones cíclicos que varían en duración. Los estudios recientes se han enfocado a observar la liberación pulsátil y circadiana de las hormonas pituitarias. Ahora es evidente que las hormonas hipotalámicas y pituitarias se sintetizan y se liberan bajo un patrón pulsátil minuto a minuto. Por ejemplo, en hombres y mujeres, la liberación de FSH y LH ocurre cada 30 a 40 minutos como consecuencia de una secreción pulsátil del factor liberador de gonadotropinas (GnRH) por parte del hipotálamo. Reforzando esta acción, la glándula pituitaria exhibe un cambio cíclico en su secreción durante las 24 horas del día, denominado ritmo circadiano. La magnitud y frecuencia de la liberación pulsátil de la pituitaria son diferentes para cada hormona. Por ejemplo el caso de la ACTH en el cual hay un ritmo circadiano característico durante el día, con un rendimiento más alto en las horas de la mañana y un nadir alrededor de la medianoche. Los picos de liberación de hormona de crecimiento aumentan en amplitud y frecuencia durante los periodos REM del sueño, que comprende aproximadamente desde la medianoche a 4:00 de la mañana. En mujeres, se adiciona el factor de la ciclicidad, menstrual de las hormonas reproductivas pituitarias LH y FSH que ocurren durante el curso de 30 días (ver Capítulo 45). La pulsatilidad y el patrón secretorio son consideraciones importantes cuando se quiere interpretar los valores de los niveles hormonales, dentro del contexto de los ritmos biológicos normales.

Control de disponibilidad de la hormona.

Las hormonas son compuestos potentes, biológicamente activos. Su actividad fisiológica es controlada por los cambios en las velocidades de síntesis y liberación. Sin embargo, otros mecanismos que actúan limitando la disponibilidad de las hormonas después de que han sido liberadas en la circulación, son el catabolismo rápido y su secuestro.

Catabolismo-hormonas peptídicas.

Excepto por las hormonas tiroideas, las hormonas derivadas de péptidos y aminoácidos son hidrosolubles y se encuentran libres en el plasma. Sin embargo, poseen una vida media corta debido al catabolismo rápido ya que las enzimas de tejido y plasma reducen la disponibilidad de la hormona intacta original. Por ejemplo, la PTH se libera de la glándula paratiroides como un péptido intacto de 84 aminoácidos en pocos minutos sufre la acción de enzimas proteolíticas circulantes que la reducen a fragmentos inactivos. Así el control de los niveles de hormona activa depende de un equilibrio entre la síntesis y liberación desde los tejidos y la inactivación metabólica.

Secuestro-transporte de hormonas esteroideas y tiroideas libres y ligadas.

El control inmediato de la actividad de las hormonas esteroideas y del tiroides en plasma es ejercido por el secuestro de la mayoría de la hormona en una forma inactiva ligada a

proteínas. Puesto que las hormonas esteroideas no son hidrosolubles, las proteínas plasmáticas les sirven como el medio de transporte. Las proteínas transportadoras /enlazantes que se sintetizan en el hígado, se encuentran en la Tabla 43-2. Hay generalmente tres grupos de hormonas que son, en orden de biodisponibilidad creciente, las unidas a proteínas específicas con gran afinidad; las unidas a proteínas pero con baja afinidad y las que se hallan totalmente libres en el plasma. Un ejemplo es la testosterona unida a sus respectivas proteínas que se muestra en Fig. 43-10. En el caso de las hormonas tiroideas, participan tres proteínas diferentes, en el transporte de T3 y T4 en la circulación cada una con distintas afinidades de enlace: globulina fijadora de tiroxina, prealbúmina y albúmina (ver capítulo 44). Se piensa que las hormonas que se unen con gran afinidad a las proteínas representan una forma de almacenamiento que no es biodisponible en forma inmediata, por lo tanto el organismo trata de mantener su reserva en forma libre o ligada débilmente a proteínas transportadoras.

Transporte de hormonas libres y ligadas a proteínas

Muchas proteínas sirven como transportadoras y como una forma de almacenamiento de hormonas en la circulación (Ver arriba). La albúmina y prealbúmina sirven como proteínas de transporte para las hormonas esteroideas y del tiroides. La unión anterior se realiza de una manera débil, con una constante de afinidad mucho menor que la que liga dichas hormonas a su receptor en el tejido, en consecuencia las hormonas unidas a la albúmina y prealbúmina son una forma de hormona libre unidas débilmente y se consideran estar disponibles fácilmente para los tejidos. Anteriormente se creía que las hormonas biodisponibles solo eran las que se hallaban en forma libre pero ahora se conoce que las débilmente unidas a proteínas también son utilizadas rápidamente por el organismo. Este nuevo concepto ha permitido ampliar la definición de hormona libre no solo la que se encuentra no ligada sino la que se halla débilmente unida.

Además de las proteínas de transporte de baja afinidad como la albúmina existen otras específicas. Estas proteínas tienen una alta afinidad por las hormonas que transportan muy similar a las características de especificidad y enlace de los receptores intracelulares; y por lo tanto influyen en la velocidad de depuración metabólica para las hormonas. Hay varias consideraciones importantes, que subrayan el papel de todas las proteínas transportadoras de hormonas en la circulación. Las proteínas de unión de alta afinidad, actúan como reservorios para el almacenamiento y transporte de las hormonas. Una vez que las hormonas son liberadas al tejido, se hacen ajustes circulatorios en el nivel hormonal libre a través de un intercambio y reequilibrio entre la hormona unida fuertemente a proteínas transportadoras específicas y la unida débilmente. La disminución en la hormona circulante se compensa a través de la activación de una retroalimentación positiva a altos centros de control como el eje hipotálamo – pituitario. Este garantiza una disponibilidad continua de hormonas vitales como T4 y cortisol con un reservorio circulante continuo que se puede utilizar tan pronto se requiera.

Muchos laboratorios actualmente miden la hormona biodisponible (libre y unida a albúmina o prealbúmina), mientras que anteriormente se realizaba la determinación de la hormona en su forma libre. Un ejemplo de la utilidad de la medición de las fracciones libre y débilmente ligada es la testosterona (Ver Fig. 43-10) la cual esta unida a la globulina transportadora de hormonas sexuales (SHBG) y débilmente a la albúmina. Solo una pequeña parte de la testosterona (<10%) se halla libre, cuando la sangre perfunde a un órgano que



contiene receptores para la testosterona, las fracciones libres y ligadas a la albúmina están disponibles para unirse a los receptores específicos. Por lo tanto se usa el término testosterona biodisponible para describir las fracciones libres y ligadas a la albúmina de la hormona total circulante. Algunas hormonas esteroideas como la dehidroepiandrosterona (DHEA), un esteroide androgénico producido por las glándulas adrenales, carecen de una proteína de transporte específica. Para compensar esta deficiencia, la DHEA es sulfatada en la posición 3 – Hidroxilo de la molécula básica del esteroide. Este paso incrementa la solubilidad para ser transportada en la circulación. Por lo tanto la DHEA circula en forma de DHEA-S en la sangre.

Acción de las hormonas locales y factores de crecimiento

El conocimiento básico de endocrinología define a una hormona como producida por una glándula especializada en una parte del organismo y que viaja a través del torrente circulatorio a un sitio distante para realizar su efecto biológico. El descubrimiento reciente de ciertos factores de crecimiento ha revolucionado la percepción de la endocrinología clásica. Como las hormonas, estos factores de crecimiento pueden ser reguladores extracelulares de la función y crecimiento celular. La principal diferencia es que la acción de los factores de crecimiento es local y esta basada en la comunicación célula a célula dentro del ambiente celular y tisular.

Se han acuñado términos como autocrino y paracrino para describir la síntesis y liberación local de factores de crecimiento que interactúan con receptores en células vecinas del mismo tejido (acción paracrina) o con receptores de la misma célula que libera el factor de crecimiento (acción autocrina) Figura 43-11.

El tracto gastrointestinal es un buen ejemplo de interacción local reguladora entre hormonas, factores de crecimiento y neurotransmisores que influyen la función celular a través de la comunicación célula a célula (Ver capítulo 30). Una analogía de este sistema se puede observar en el caso de la comunicación a través de las citoquinas entre las células linfoides del sistema inmune y las células de un tejido particular como los macrófagos tisulares y las células epiteliales.

Dos términos adicionales se han utilizado para describir la comunicación de los factores de crecimiento con el ambiente celular. Intracrino se refiere a un factor del citosol que viaja al núcleo de la misma célula para ligarse a receptores específicos en una región del DNA en la cromatina y yuxtacrino que describe la comunicación celular directa provocada por los factores de crecimiento que se encuentran anclados en las membranas de cada una de las células. Cuando las células entran en contacto entre sí, los factores de crecimiento unidos a la membrana influyen directamente la célula vecina. En la medida en que se sigan expandiendo la familia de los factores de crecimiento, se requerirá una reclasificación de la nomenclatura para asignarles a las hormonas factores de crecimiento y péptidos neurales su localización y función correcta.

Eje Hipotálamo-Pituitaria

Hipotálamo

El hipotálamo ejerce control sobre la función de la pituitaria tanto en su neuroestimulación como en la neurosecreción. Su posición anatómica en la base del cerebro

permite conexión anatómica y nerviosa con la pituitaria a través del tallo de la hipófisis y la circulación portal asegura la interdependencia de estos dos órganos importantes. La pituitaria está formada por dos lóbulos: anterior y posterior. Fig. (43-12). El hipotálamo inerva indirectamente el lóbulo posterior (neurohipófisis) y la estimulación ejercida por el hipotálamo causa la liberación de las hormonas peptídicas almacenadas como arginina vasopresina (AVP) y oxitocina. Estas hormonas son sintetizadas por las células neurosecretoras del hipotálamo y son almacenadas en la neurohipófisis. Por el contrario, el lóbulo anterior (adenohipófisis) responde a los neuropéptidos derivados del hipotálamo los cuales son liberados directamente en la circulación portal, lo que conlleva a una secreción de las correspondientes hormonas pituitarias. (Ver Tabla 43-1).

Además de los factores de liberación clásicos hipotalámicos, existe un péptido hipotalámico la somatostatina que ejerce una influencia negativa sobre la TSH, GH y otras secreciones hormonales incluyendo hormonas pancreáticas y gastrointestinales. La somatostatina es un péptido sintetizado no solamente por el hipotálamo sino por el páncreas y tracto gastrointestinal, se sintetizan isoformas diferentes en el cerebro y el tracto gastrointestinal. Esta neurohormona ejerce un gran efecto inhibitorio tanto en la síntesis de GH y TSH como en la secreción de estas hormonas de la pituitaria, La somatostatina inhibe virtualmente todas las secreciones endocrinas incluyendo gastrina, insulina, glucagón y secretina, del tracto gastrointestinal, páncreas y vesícula biliar. Su principal papel es atenuar la hipersecreción de estas hormonas en estados patológicos como en los tumores secretorios endocrinos como insulinomas y carcinomas. Los análogos de somatostatina se han utilizado como agentes terapéuticos efectivos para tratar tumores pituitarios endocrinos secretorios como en la acromegalia y tumores pancreáticos como los insulinomas.

Neurohipófisis

La neurosecreción de vasopresina y oxitocina tiene funciones especializadas en la fisiología de los mamíferos que comprenden conservación de agua en el organismo (antidiurética) y propiedades de contracción del músculo liso. La arginina vasopresina (AVP) es el principal factor homeostático que ayuda a mantener una concentración normal de agua en la sangre, regulando el volumen plasmático y la osmolalidad sérica de una manera estricta. El control del volumen sanguíneo representa un papel importante en el mantenimiento de la presión sanguínea (Ver pág. 933). La liberación de AVP ocurre inmediatamente en respuesta al incremento en la osmolalidad plasmática y actúa en el riñón aumentando la reabsorción de agua en los túbulos distales y los ductos colectores. La AVP participa también en la regulación del volumen. Una reducción súbita del volumen sanguíneo de más del 10% como puede suceder en una hemorragia masiva, puede provocar una liberación rápida de AVP. Los receptores de volumen para la AVP se localizan en el corazón y en el seno carotideo, bajo condiciones normales la liberación de AVP, ocurre como respuesta a los cambios en la osmolalidad plasmática. Sin embargo la pérdida severa de volumen puede sobrepasar la influencia de la osmolalidad para la liberación de AVP.

La oxitocina posee un papel en la fisiología de los mamíferos que va mas allá del comportamiento reproductivo. La liberación de oxitocina se realiza luego de recibir un reflejo neurogénico transmitido desde las terminaciones nerviosas en el pezón mamario. El estímulo es transportado a través de la médula espinal, mesencéfalo y por último al hipotálamo. La succión del seno induce la liberación de oxitocina que causa la contracción de las células



epiteliales que encierran los ácinos mamarios. Esto produce expulsión de leche de los ductos lácteos del seno, conocido como “ bajada de la leche” lo cual es un evento clave en la alimentación mamaria. La oxitocina también ayuda en la inducción del parto estimulando la contracción del músculo liso no vascular del útero. Aunque la señal exacta que precipita el comienzo del trabajo de parto no ha sido identificada, los receptores de oxitocina en el útero traducen la señal de la oxitocina y producen cambios contráctiles y rítmicos del miometrio y por ende los eventos físicos del parto.

La secreción de oxitocina y AVP en la pituitaria posterior ocurre independientemente, por lo tanto se cree que las dos son controladas por mecanismos independientes.

Adenohipófisis

El lóbulo anterior de la hipófisis es el responsable de la secreción de hormonas tróficas que controlan el sistema endocrino. Como se notó previamente, la diferenciación de las células de la pituitaria, la proliferación, y la síntesis de las hormonas están controladas por factores neurosecretores de origen hipotalámico. Los factores liberadores son péptidos excepto la dopamina (Tabla 43-3), la cual, es un neurotransmisor, que se sintetiza y se libera en el hipotálamo y representa un papel importante en la regulación de la secreción de las hormonas pituitarias. Se cree, además, que la dopamina es el principal regulador de la secreción de prolactina, ejerciendo una inhibición continua y sostenida en su liberación. Además, inhibe también la secreción de TSH, FSH, LH, y GH.

Aunque cada factor liberador hipotalámico tiene una hormona blanco, ocurren algunas interacciones con otras hormonas. Por ejemplo, TRH causa la síntesis y liberación de la TSH y también de prolactina. Igualmente, LH-RH estimula la liberación de FSH y LH. Sólo CRH y GH-RH actúan estimulando la liberación de una sola hormona de la pituitaria. Todos los factores liberadores interactúan con la pituitaria a través del mismo mecanismo receptor usado por otras hormonas peptídicas. Aunque ellos generalmente se limitan a la circulación portal, varios factores liberadores han sido medidos en sangre y orina. Se han descrito efectos directos sobre el órgano blanco para LH-RH en el ovario y los testículos. El significado fisiológico exacto de esta interacción todavía es incierto.

Condiciones Patológicas

Las enfermedades y desórdenes del eje hipotálamo-pituitario pueden presentarse a cualquier edad y producir diferentes síntomas que son a menudo sutiles en su presentación. Muchas formas tempranas de enfermedad endocrina sólo se detectan con la utilización de pruebas dinámicas. En los jóvenes las causas más frecuentes de alteración en la regulación de los niveles de hormonas centrales son las infecciones bacterianas, tumores, y el trauma de cabeza. En el anciano, la enfermedad vascular, enfermedades inflamatorias, y las deficiencias nutritivas son causas adicionales de desórdenes del sistema neuroendocrino (Tabla 43-4). Asociado con estas enfermedades hay déficit en la retroalimentación autorregulada de los órganos blanco. La pérdida de ritmo circadiano, por ejemplo, de secreción de ACTH durante infección bacteriana provoca alteración en la función pituitaria-suprarrenal. Este efecto puede ser sutil pero no obstante importante, debido a que la producción del cortisol es un factor



clave en el control de la función celular inmune. No pudiéndose determinar los niveles de la hormona en la circulación portal fácilmente, dependemos de la medición de las hormonas pituitarias en la circulación sistémica que proporciona una imagen clínica de los eventos a nivel del hipotálamo en salud y enfermedad.

Las anormalidades en la secreción hormonal se definen usualmente en función de los niveles séricos de la hormona, o sea, altos o bajos y la glándula endocrina que demuestra directamente la anormalidad. La enfermedad se define de acuerdo al sitio de producción de la hormona, si es producida por el órgano blanco (enfermedad primaria), una enfermedad de la glándula pituitaria que controla la glándula primaria (enfermedad secundaria), una enfermedad del hipotálamo que controla la pituitaria (enfermedad terciaria), o una incapacidad del tejido del órgano blanco para responder a la hormona (órgano final o enfermedad cuaternaria). Por ejemplo, el hipertiroidismo secundario se define por los niveles aumentados de tiroxina que es el resultado de una producción excesiva de TSH por la glándula pituitaria.

Deficiencia de hormonas pituitarias

Las deficiencias de un tipo específico de células de la pituitaria pueden producir falla primaria. Una lista de las causas primarias de hipopituitarismo se describe en la Tabla 43-4.

Fallas secundarias a nivel de la pituitaria pueden ocurrir como resultado de una deficiencia o exceso en uno o más de los factores hipotalámicos de liberación causados por infección, tumores, o un defecto congénito. Tumores hipotalámicos, como el craneofaringioma, o los procesos inflamatorios del cerebro, como meningitis, pueden producir síntesis inadecuada de ciertos factores liberadores que llevan al compromiso eventual en la síntesis de las hormonas por la pituitaria. Por ejemplo el hipotiroidismo - hipotalámico, es un síndrome de deficiencia de secreción de TRH que se diagnostica inicialmente por encontrar un nivel circulante suprimido de TSH. La utilización de una prueba dinámica aplicando estímulo con TRH intravenoso puede ayudar a clasificar el origen hipotalámico de la deficiencia de TRH.

Una deficiencia aislada de LH-RH es la forma más común de deficiencia de hormonas hipotalámicas y puede ser causada por un defecto congénito en el desarrollo de las neuronas que contienen el LH-RH en la vida embrionaria. Una deficiencia en la liberación del factor liberador de hormona de crecimiento (GH-RH) es también otro desorden hipotalámico; ocasionando como consecuencia un enanismo idiopático. Esta enfermedad se diagnostica por encontrar niveles inapropiados de hormona de crecimiento circulante antes y después de la prueba de estímulo. Deficiencias de TRH, LH-RH, GH-RH, y CRH han sido descritas y son clasificadas como hipofunción endocrina de tipo terciario.

Exceso de hormonas de la pituitaria

Hiperpituitarismo primario.

La causa principal de la hipersecreción de las hormonas de la pituitaria, es la presencia de un adenoma pituitario o tumor benigno de origen hipofisiario. Los adenomas hipofisiarios productores de prolactina son los más comunes. La secreción de prolactina, que normalmente está bajo el efecto del control negativo de su factor liberador neurosecretorio la dopamina, se secreta sin control en grandes cantidades en los prolactinomas hipofisiarios. Los tumores secretores de prolactina son más comunes en mujeres, las alteraciones del ciclo menstrual



normal y la amenorrea son una manifestación temprana de la enfermedad. Las mujeres con prolactinomas manifiestan galactorrea, o sea, una secreción anormal de líquido por el pezón del seno. Los hombres que desarrollan un prolactinoma, son menos afortunados que las mujeres debido a que normalmente no presentan el estado de microadenoma. El crecimiento del tumor pituitario secretor de prolactina continua sin que se presenten manifestaciones clínicas y el tumor alcanza el tamaño de un macroadenoma, momento en el cual aparecen los síntomas. Los síntomas clásicos, son: dolor de cabeza, impotencia, y alteraciones del campo visual como consecuencia del tamaño del tumor que comprime el nervio óptico. El diagnóstico de un prolactinoma usualmente se confirma por la presencia de los niveles en sangre de prolactina superiores a 200 ng/mL .

Los tumores productores de hormona de crecimiento y de ACTH también son desórdenes pituitarios relativamente comunes, aunque de prevalencia más baja que los prolactinomas. El exceso de hormona de crecimiento se caracteriza por el desarrollo de rasgos de acromegalia, incluyendo crecimiento de tejidos blandos y cartilagosos produciendo rasgos característicos de gigantismo. La relación de exceso de hormona de crecimiento y enfermedad es llamada acromegalia. El principal efecto de la hormona de crecimiento es inducir la síntesis de factor de crecimiento similar a la insulina (FCI-1) por el hígado. En los pacientes con acromegalia, se incrementan los niveles de FCI-1 mas significativamente que los de hormona de crecimiento. La disponibilidad reciente de inmunoensayos comerciales para FCI-1 ha permitido la medida rutinaria de este factor de crecimiento circulante que ayuda en el diagnóstico y supervisión de la acromegalia.

Los adenomas hipofisarios productores de ACTH también son comunes y llevan a la condición patológica conocida como Síndrome de Cushing (Ver capítulo 46). El síndrome esta asociado con hiperplasia suprarrenal bilateral y con las manifestaciones clínicas de la sobreproducción de cortisol como consecuencia del exceso de ACTH. También se han descrito adenomas pituitarios productores de TSH que producen la hiperestimulación de la glándula tiroidea pero son menos frecuentes.

Hiperpituitarismo secundario.

La hipersecreción pituitaria puede ser inducida por numerosos factores incluyendo tumores neurogénicos del hipotálamo. La sobreproducción de factores liberadores hiperestimulan la pituitaria, conduciendo a una liberación excesiva de hormonas pituitarias que dejan sin efecto los mecanismos de la retroalimentación negativa. Como ejemplo de causas secundarias de hiperpituitarismo y de hipersecreción de factores liberadores se encuentran la hipersecreción de LH-RH asociada con la pubertad precoz, los gangliocitomas secretores de GH-RH que producen acromegalia, y tumores secretores de CRH que producen la enfermedad de Cushing. Los desórdenes hipotalámicos son relativamente raros, comparados con los producidos en la glándula pituitaria que producen enfermedad primaria.

La secreción excesiva de AVP puede provocar retención excesiva de agua y una expansión peligrosa del volumen plasmático. La liberación excesiva de AVP, la cual conduce a la condición clínica conocida como SIADH (síndrome de secreción inapropiada de hormona antidiurética) es consecuencia del daño cerebral resultante del trauma físico, infecciones o tumores. La producción ectópica de AVP a través de ciertos tumores también puede ocasionar la retención inapropiada de agua.

El control del mecanismo de la sed en el cerebro también se asocia a la secreción de

AVP por la neurohipófisis. Tanto la conducta de tomar agua como la liberación de AVP parecen ser activadas por estímulos hiperosmóticos resultando en la necesidad de completar el agua plasmática en estados de deshidratación. El SIADH está asociado con hiponatremia y la producción de orina que es relativamente mas hipertónica que el plasma, a pesar de tener normal la función suprarrenal y renal. Clínicamente, el SIADH se asocia con síntomas como malestar, debilidad muscular, y estado mental deficiente, que finalmente puede progresar a convulsiones.

Pruebas de Función Hipotálamo-Pituitaria

La evaluación de la enfermedad pituitaria es a menudo difícil de diagnosticar debido a que la presentación de la enfermedad es muy sutil. El diagnóstico normalmente requiere de la utilización de pruebas dinámicas que evalúen la función de la glándula suprimiendo o estimulando la glándula pituitaria a través de la aplicación de la hormona exógena, o la estimulación de síntomas con estrés o ejercicio. Éstas pruebas miden las hormonas pituitarias específicas. Para cada adenoma pituitario hay una prueba específica que se emplea para confirmar la sospecha clínica. Se deben tener en cuenta muchos factores, que pueden afectar la interpretación de las pruebas funcionales, como son: La naturaleza pulsátil de la secreción de la hormona pituitaria, la hora del día en que se realiza la prueba, si se presenta estrés o infección y la concentración de hormona circulante. Además, la disponibilidad que tienen los laboratorios clínicos a una gran variedad de inmunoensayos con diferentes especificidades y sensibilidades que pueden afectar la interpretación de las pruebas funcionales.

E de ACTH

Prueba de supresión con dexametasona (ver pág. 925).

Se sospecha la presencia de un tumor productor de ACTH cuando hay una elevación anormal de los niveles de cortisol en orina o sangre. En estos pacientes, la determinación de cortisol se hace con la prueba de supresión con dexametasona a dosis bajas. Una falta de supresión del cortisol sugiere un tumor pituitario. Posteriormente, se da una dosis superior de dexametasona que provocara una supresión moderada pero todavía incompleta de cortisol en los pacientes con adenomas pituitarios funcionales.

En los casos en que el exceso de cortisol es producido por ACTH de origen ectopico no se suprime ni por dosis bajas o altas de dexametasona.

Deficiencia de GH

Prueba de reto a la insulina.

La prueba que se utiliza normalmente para detectar un problema de deficiencia de hormona de crecimiento en niños es la de reto a la insulina. La mayoría de los endocrinólogos pediatras solicitan una prueba combinada de hipoglicemia inducida por insulina que produce estrés a través de una sensibilidad de los receptores de carbohidratos y la droga levodopa (l-dopa) que actúa en el SNC (sistema nervioso central) para inducir una descarga pituitaria de



GH. La insulina normalmente se administra primero y posteriormente se recolectan muestras de sangre para medir GH en intervalos de tiempo de 30 minutos por 90 minutos. Posteriormente se administra la l-dopa con recolección adicional de sangre para medir GH cada 30 minutos hasta los 120. Debido a la influencia del estrés producido por la venipunción, pueden elevarse los niveles basales lo cual puede causar errores en la interpretación de los resultados. La reciente disponibilidad del factor liberador GH-RH para uso clínico ha sido una buena herramienta que permite diagnosticar pacientes con manifestaciones sutiles de deficiencia de hormona de crecimiento por la pituitaria. La administración de GH-RH y la medida de GH es útil en deficiencias de crecimiento que son de origen hipotalámico.

Hipogonadismo Secundario

Prueba de LH-RH.

LH-RH normalmente se aplica intravenosamente para estimular la secreción pituitaria de FSH y LH; niveles de FSH y LH bajos después de esta prueba sugieren un hipopituitarismo. Los análogos de LH-RH están disponibles para el uso pruebas de estimulación y en el tratamiento de una variedad de desórdenes reproductivos y tumores malignos, como endometriosis y cáncer de la próstata.

Cambio del Compuesto Analizado en la Enfermedad

Prolactina

La secreción pulsátil de prolactina tiene poco efecto tanto en la medida como en la interpretación para el diagnóstico de un prolactinoma debido a los niveles altos que normalmente se presentan en esta enfermedad. La hipersecreción de Prolactina normalmente se confirma simplemente por la observación de un nivel basal elevado. Un nivel de prolactina mayor de 200 ng/mL es virtualmente diagnóstico de un prolactinoma. Elevaciones moderadas de prolactina (25 a 50 ng/mL), se pueden deber sin embargo como respuesta al estrés de la venipunción o simplemente después del examen físico de los senos, por lo cual se deben obtener medidas repetidas cuando se presentan elevaciones no muy significativas, para confirmar la presencia de un prolactinoma. Niveles hasta 150 ng/mL que son elevaciones de aproximadamente diez veces, pueden encontrarse en individuos normales que están recibiendo ciertos medicamentos. Las fenotiazinas y medicamentos antiúlcera, como Tagamet, pueden producir un aumento significativo en la secreción de prolactina, de tal manera que una historia cuidadosa de que drogas esta tomando el paciente es importante cuando se evalúan pacientes con niveles elevados de prolactina. Es usualmente necesario practicar una tomografía axial computarizada (TAC) a la pituitaria de los pacientes con niveles elevados de prolactina para confirmar la presencia de un tumor.

ACTH

Normalmente se diagnostican los pacientes con una adenoma pituitario productor de ACTH encontrándose una elevación en los niveles basales de cortisol en sangre; no se

necesitan mediciones de ACTH rutinariamente en estos casos. Las mediciones de ACTH son más usadas en pacientes que requieren localización del tumor dentro de la pituitaria antes de la ablación quirúrgica del adenoma. En estos casos, las muestras de sangre se toman del seno petroso. Ocasionalmente en los pacientes con una sospecha de un tumor productor de ACTH de origen ectópico, se les deberá medir en sangre la ACTH. Se encuentran los valores más altos para ACTH en pacientes que producen este péptido de una fuente tumoral. La prueba de supresión de dexametasona se usa para confirmar este diagnóstico (ver anteriormente). Los niveles elevados sostenidos de ACTH pueden ser de ayuda en establecer la presencia de una fuente no pituitaria para la producción de la ACTH. Los tumores del pulmón, particularmente el carcinoma de célula de avena, se asocian comúnmente con fuentes no pituitarias de producción de ACTH. Los niveles en sangre de ACTH en un paciente con una adenoma pituitario rara vez exceden 1000 pg/mL; sin embargo, con una fuente de origen ectópica se encuentran niveles superiores a esta concentración. También se asocian tumores pancreáticos con liberación ectópica de ACTH.

Las mediciones de ACTH no se usan rutinariamente. Lo anterior debido a la vida media corta de la ACTH, lo que hace que los requisitos de la recolección de las muestras sean muy estrictos. Esto además de la inestabilidad de este péptido (se requieren antiproteasas en el tubo para la recolección), y la necesidad de almacenar las muestras inmediatamente a -20°C son factores que impiden el uso rutinario y dificultan la interpretación de un resultado de ACTH.

Hormona de crecimiento

La hormona de crecimiento se secreta en individuos sanos en forma pulsátil, produciéndose mayor cantidad durante la fase inicial del sueño. Durante el día, los niveles en sangre de GH pueden encontrarse en el rango de no detectables hasta 5 ng/mL. Sin embargo, los niveles de GH pueden estar influenciados por estrés y también por la reciente ingestión de comida, los carbohidratos suprimen y las proteínas estimulan la secreción de GH. Así, una sola determinación de GH no es útil para establecer una liberación inadecuada o excesiva de GH por la pituitaria. Cuando se sospecha una deficiencia de GH es indispensable practicar una prueba de estimulación (ver anteriormente).

Para evaluar la hipersecreción pituitaria de hormona de crecimiento en un paciente con sospecha de tener acromegalia se puede medir la concentración de somatomedina C, o FCI-1. La concentración de este factor hepático que media los efectos de la hormona de crecimiento, se incrementa en la circulación en pacientes con acromegalia, y su medida puede ser útil para confirmar el diagnóstico en estos casos dudosos. Las medidas de FCI-1 también son útiles para supervisar la terapia de pacientes con acromegalia en tratamiento.

TSH

El advenimiento de los ensayos de TSH ultrasensible ha hecho que la medición de dicha hormona sea muy valiosa en el diagnóstico de hipo e hiperfunción del eje pituitaria-tiroides. Antes del desarrollo de esta técnica altamente sensible, era muy importante realizar pruebas de estimulación con TRH que ayudaban a distinguir las enfermedades hipotalámicas de las pituitarias como causa de los desordenes del tiroides. Esta prueba es particularmente útil cuando debían clasificarse y diferenciarse el hipertiroidismo del eutiroidismo. Los ensayos

ultrasensibles pueden mostrar la secreción aumentada o normal de TSH obviando la necesidad de realizar una prueba de estimulación con TRH. Los niveles basales de TSH son un parámetro importante para determinar la funcionalidad de la pituitaria. Un nivel basal de TSH menor a 0.05 $\mu\text{UI/ml}$, por ejemplo, indica prácticamente la existencia de un hipertiroidismo primario por causa a determinar. La prueba de TRH se ha ido abandonado por la mayoría de los médicos y se ha reservado solo para el diagnóstico diferencial de enfermedad tiroidea debida a desordenes en el hipotálamo en pacientes con una enfermedad de presentación más compleja. (Ver pág. 881). Los que tienen un nivel aumentado de TSH por encima de 10 $\mu\text{UI/mL}$ son sospechosos de tener hipotiroidismo y cuando los niveles exceden los 25 $\mu\text{UI/mL}$, el diagnóstico usualmente es hipotiroidismo primario.

FSH/LH

De todas las hormonas pituitarias influenciadas por la liberación pulsátil, las gonadotropinas son las más afectadas. En hombres dicha pulsatilidad no interfiere con la utilidad clínica de la medición de gonadotropinas, la cual se realiza con el fin de demostrar enfermedad primaria gonadal. Los niveles de testosterona se determinan como una indicación bioquímica de diagnóstico de hipogonadismo en hombres. La prueba de estimulación con LHRH en hombres, se usa para confirmar el hipogonadismo hipogonadotrópico (hipogonadismo secundario) (Ver arriba).

En mujeres la situación es mas complicada debido a que el ciclo menstrual, la menopausia. La pulsatilidad y frecuencia de la secreción hipotalámica de LHRH afectan la interpretación de los niveles séricos de LH y FSH. Una sola medición de gonadotropinas es de muy poca ayuda en las mujeres, a menos, que solo se quiera determinar la probabilidad de menopausia. En este caso es mejor medir FSH que LH. En el esclarecimiento de las causas de infertilidad, amenorrea y desordenes del eje hipotálamo pituitario – ovario, se requieren múltiples determinaciones de gonadotropinas (Ver pág. 902). Una alternativa es medir los niveles de dichas hormonas en orina en un periodo determinado de tiempo, la cual integra la secreción pulsátil y concentra las gonadotropinas para usarlas en diferentes diagnósticos clínicos. Los endocrinólogos pediatras utilizan rutinariamente determinaciones de gonadotropinas urinarias para diagnosticar pubertad retardada, pubertad precoz y desordenes funcionales del eje pituitaria– ovarios y pituitaria – testículos en niñas y niños respectivamente.

En general, las pruebas dinámicas de función pituitaria permiten conocer la causa real de un desorden específico. Con la disponibilidad de los 4 principales factores liberadores, GHRH, CRH, LHRH y TRH, se pueden observar y monitorear las respuestas de la pituitaria midiendo las correspondientes hormonas estimuladas, permitiendo a los médicos distinguir entre las enfermedades hipotalámicas y pituitarias, y determinar la función adecuada del eje hipotálamo – pituitaria endocrino.

Bibliografía

Wilson JD, Foster DW: *Williams' textbook of endocrinology*, ed 8, Philadelphia, 1992, Saunders.

DeGroot LJ: *Endocrinology*, Philadelphia, 1989, Saunders.



Besser GM: *Clinical Endocrinology*, ed 2, St. Louis, 1994, Mosby.

Hall R: *Color atlas of endocrinology*, ed 2, St. Louis, 1990, Mosby.

Tablas

Tabla 43-1. Esteroides y hormonas peptídicas.

Hormona	Fuente	Órgano blanco	Nivel circulante	Efecto biológico
Hormonas esteroidales				
Andrógenos				
Testosterona (dihidrotestosterona)	Testículos	Glándulas sexuales accesorias	3.0 -10ng/ml	Hombre, características sexuales secundarias, anabolismo proteico
DHEAS (Sulfato de dehidro- epiandrosterona)	Suprarrenales	Hígado, tejido graso	1500- 4000 ng/ml	Sustrato de andrógeno
Estrógenos				
Estradiol	Ovarios	Glándulas sexuales accesorias, hígado, cerebro	50- 300 pg/ml	Mujeres, características sexuales secundarias
Estrona		Glándulas sexuales accesorias	50-200 pg/ml	Sustrato del estradiol
Progesterona	Ovario	Utero, seno, cerebro	5-20 ng/ml	Hormona del embarazo
Esteroides				
Adrenales				
Cortisol	Glándulas Suprarrenales	Hígado, músculo, cerebro y tejido graso	50-250 ug/L	Gluconeogénesis, control del sistema inmune
Aldosterona	Glándulas Suprarrenales	Riñón	50-300 ng/L	Homeostasis de la sal
Hormonas Peptídicas				
Pituitaria anterior				
TSH (Hormona estimulante de la tiroides)	Pituitaria anterior	Glándula tiroides	0.4-4.0 μ UI/mL	Biosíntesis de hormonas tiroideas



ACTH (Hormona adrenocorticotrópica)	Pituitaria anterior	Glándula suprarrenal	25-80 pg/ml	Biosíntesis de hormonas Adrenocorticales
FSH (Hormona folículo estimulante)	Pituitaria anterior	Ovario/testículo	5-20mUI/ml	Desarrollo folicular formación de ovario y esperma, testículo
LH (Hormona luteinizante)	Pituitaria anterior	Ovario/testículo	5-25 mUI/ml	Ovario, cuerpo lúteo Testículo, células de leidyg
Prolactina	Pituitaria anterior	Glándula mamaria, útero, ovario Testículo	5-20 ng/ml	Desarrollo de la glándula mamaria Ovario y testículo, producción esteroidea
GH (Hormona de crecimiento)	Pituitaria anterior	Todos los tejidos	2-5 ng/ml	Crecimiento de tejido, grasa y metabolismo de CHO
<i>Pituitaria posterior</i>				
AVP (Arginina vasopresina)	Pituitaria posterior	Riñón	2-8 pg/ml	Homeostasis del agua
Oxitocina	Pituitaria posterior	Seno, útero	1-5 pg/ml	Secreción de leche Contractilidad uterina
<i>Hormonas calcitrópicas</i>				
PTH (Hormona Paratiroidea)	Paratiroides	Hueso, riñón, intestino	10-55 pg/ml	Homeostasis del calcio
Calcitonina	Tiroides	Hueso	0-50 pg/ml_	Regulación del calcio
<i>Hormonas pancreáticas</i>				
Insulina	Páncreas	Mayoría de los tejidos	6-25 uU/ml	Metabolismo de carbohidratos
Glucagón	Páncreas	Hígado	50-100 pg/ml	Glucogenólisis
<i>Hormonas gastrointestinales</i>				
Gastrina	Estómago	Estómago	30-150 pg/ml	Secreción ácida
Secretina	Intestino delgado	Estómago, páncreas	0-50 pg/ml	Secreciones fluidas del estomago y páncreas
<i>Hormonas tiroideas</i>				



T4 (Tiroxina)	Tiroides	Todos los tejidos	40-120 ug/l	Metabolismo basal
T3 (Triyodotironina)	Tiroides	Todos los tejidos	800-2200 ng/l	Metabolismo basal

Tabla 43-2. Proteínas transportadoras de hormona.

Proteína		Hormona
GFC	(Globulina fijadora de cortisol)	Cortisol
SHBG	(Globulina fijadora de hormonas sexuales)	Estradiol, testosterona
GFT	(Globulina fijadora de tiroxina)	T ₃ , T ₄
PAFT	(prealbúmina fijadora de tiroxina)	T ₄
GFVD	(Globulina fijadora de vitamina D)	Vitamina D
ALB	(Albúmina)	Todas las hormonas

Tabla 43-3. Factores neurosecretores hipotalámicos humanos.

Vasopresina	cys-tyr-phe-gln-asn-cys-pro-arg-gly-NH ₂ (1084.38 daltones)
Oxitocina	cys-tyr-ile-gln-asn-cys-pro-leu-gly-NH ₂ (1007.35 daltones)
CRH	ser-glu-glu-pro-pro-ile-ser-leu-asp-leu-thr-phe-his-leu-leu-arg-glu-val-leu-glu-met-ala-arg-ala-glu-gln-leu-ala-gln-gln-ala-his-ser-asn-arg-lys-leu-met-glu-ile-ile-NH ₂ (4758.14 daltones)
GH-RH	tyr-ala-asp-ala-ile-phe-thr-asn-ser-tyr-arg-lys-val-leu-gly-gln-leu-ser-ala-arg-lys-leu-leu-gln-asp-ile-met-ser-arg-gln-gln-gly-glu-ser-asn-gln-glu-arg-gly-ala-arg-ala-arg-leu-NH ₂ (5040.40 daltones)
LH-RH	pglu-his-trp-ser-tyr-gly-leu-arg-pro-gly-NH ₂ (1182.39 daltones)
TRH	pglu-his-pro-NH ₂ (362.42 daltones)
Somatostatina	la-gly-cys-lys-asn-phe-phe-trp-lys-thr-phe-thr-ser-cys (1638.12 daltones)
Dopamina	3,4-dihidroxifenilmetilamina
<i>CRH</i> , Factor liberador de corticotropina; <i>GH-RH</i> , factor liberador de hormona de crecimiento; <i>LH-RH</i> , factor liberador de hormona luteinizante; <i>p</i> , pirido; <i>TRH</i> , hormona liberadora de tirotropina.	



Tabla 43-4. Desórdenes del eje hipotálamo-pituitario.

Hipopituitarismo

Congénito

- Deleciones genéticas
- Aplasia, hipoplasia,
- Desconexión de tallo pituitario
- Displacia septo-óptica
- Hipoxia

Adquirido

- Infecciones
- Trauma
- Radiaciones
- Neoplasma
- Drogas
- Cirugía

Defectos funcionales

- Deficiencia aislada de la hormona
- Enfermedad severa
- Defectos múltiples de las hormonas
- Hipotiroidismo secundario
- Hipoadrenalismo secundario
- Hiposomatotropismo
- Hipogonadismo hipogonadotrópico

Hiperpituitarismo

- Hipotalámico
- Irradiación
- Infección
- Tumor

Pituitarismo primario

- Hiperplasia o adenoma

Hipersomatotropismo

- Acromegalia
- Inanición
- Infección

Adrenocorticotropismo

- Adenoma pituitario
- Enfermedad de Addison

Tirotropina

- Hipotiroidismo primario

Hipergonadotropismo

- Falla en el órgano blanco

Hiperprolactinemia

- Sección del tallo de la pituitaria
- Embarazo
- Adenoma pituitario

Hipotiroidismo

Figuras

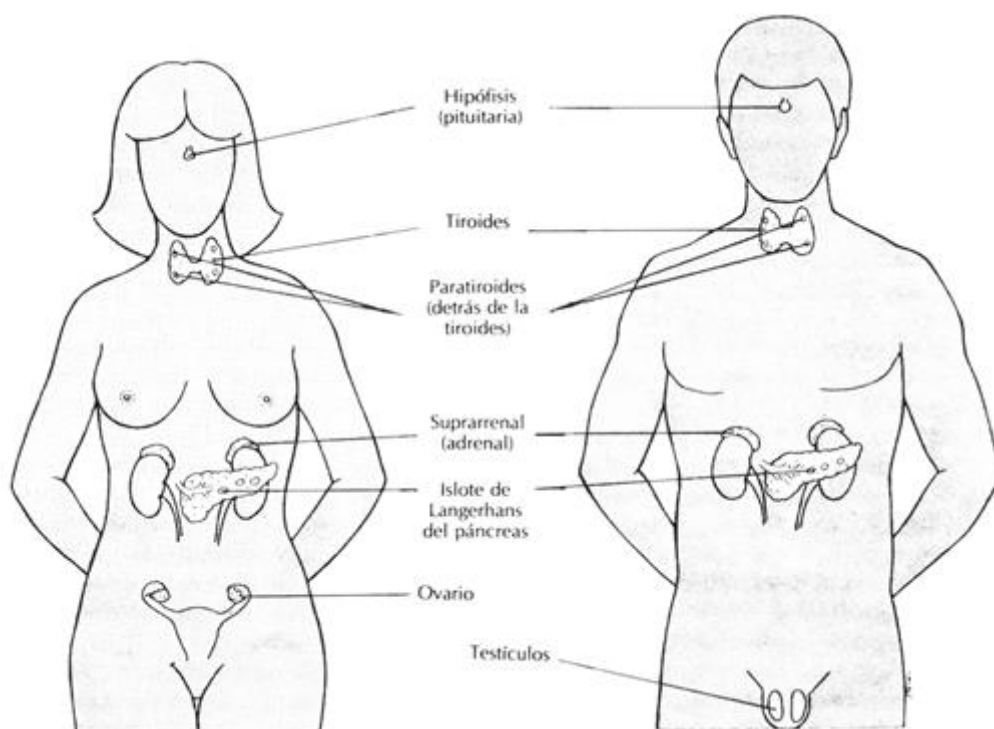


Figura 43-1 Localización de las glándulas endocrinas. (Toporek M: *Basic chemistry of life*, St. (Louis, 1980, Mosby).

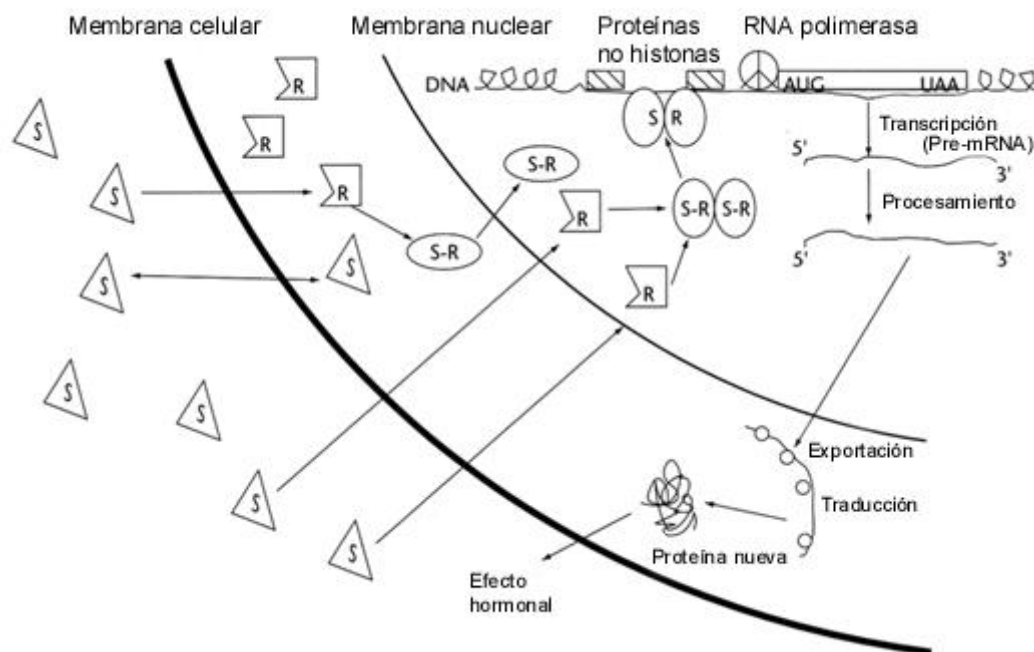


Figura 43-2 Mecanismos de acción propuestos de las hormonas esteroideas (estrogenos, andrógenos, progesterona, glucocorticoides, aldosterona). Los Esteroides, S, se difunden a través de la membrana plasmática y se ligan a un receptor de proteínas del citosol, R. El esteroide ligado activa el complejo receptor que luego se transloca al núcleo de la célula donde interactúa con la cromatina en un sitio específico de enlace en el DNA llamado el elemento de respuesta-esteroide. Esta unión activa la transcripción de los genes específicos involucrados en la acción de la hormona esteroidea. Posteriormente se realiza la transcripción del RNA mensajero y la síntesis de proteínas específicas en las células que contribuyen a la acción de la hormona esteroide.

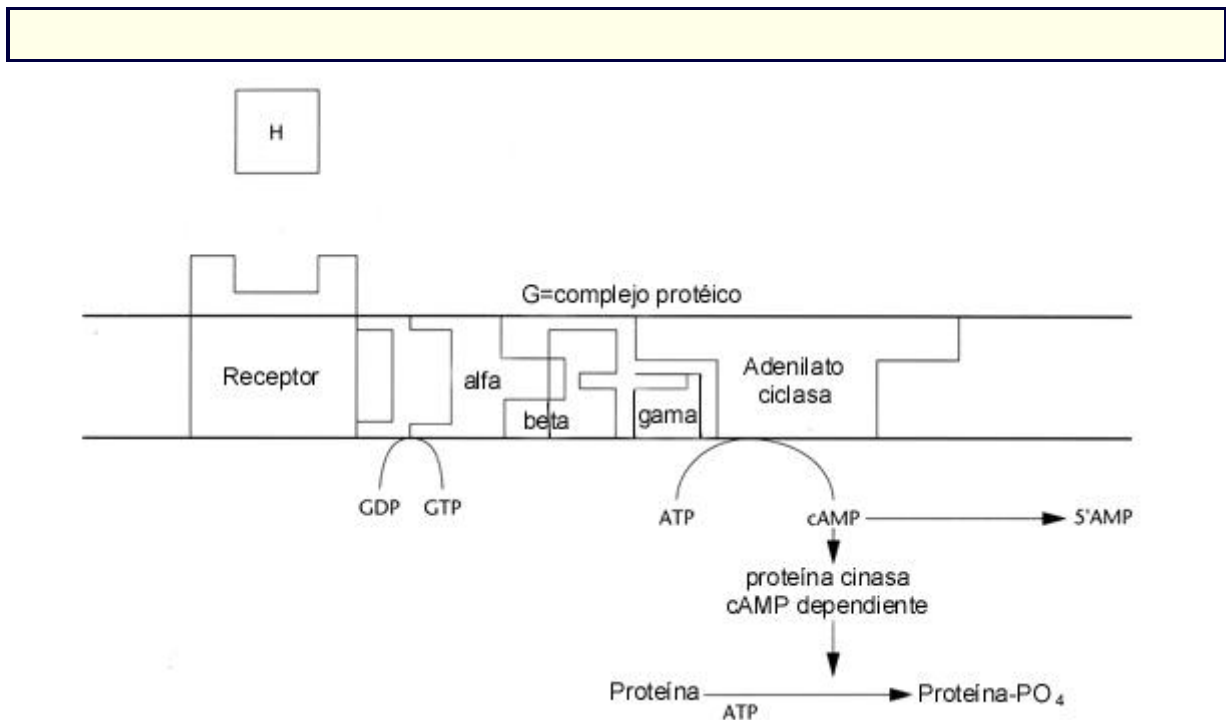


Figura 43-3 Mecanismos propuestos de acción de las hormonas pépticas. Las hormonas pépticas se ligan a un receptor específico en el dominio externo de la membrana plasmática. La hormona ligada causa la activación de un complejo proteína-G en la membrana de la célula que se acopla y activa la enzima adenilciclase. Cuando el componente catalizador de la adenilciclase y activa, el ATP se convierte en AMP cíclico que a su vez activa la proteína quinasa dependiente de cAMP, produciendo la fosforilación de la proteína y la expresión del efecto de la hormona peptídica

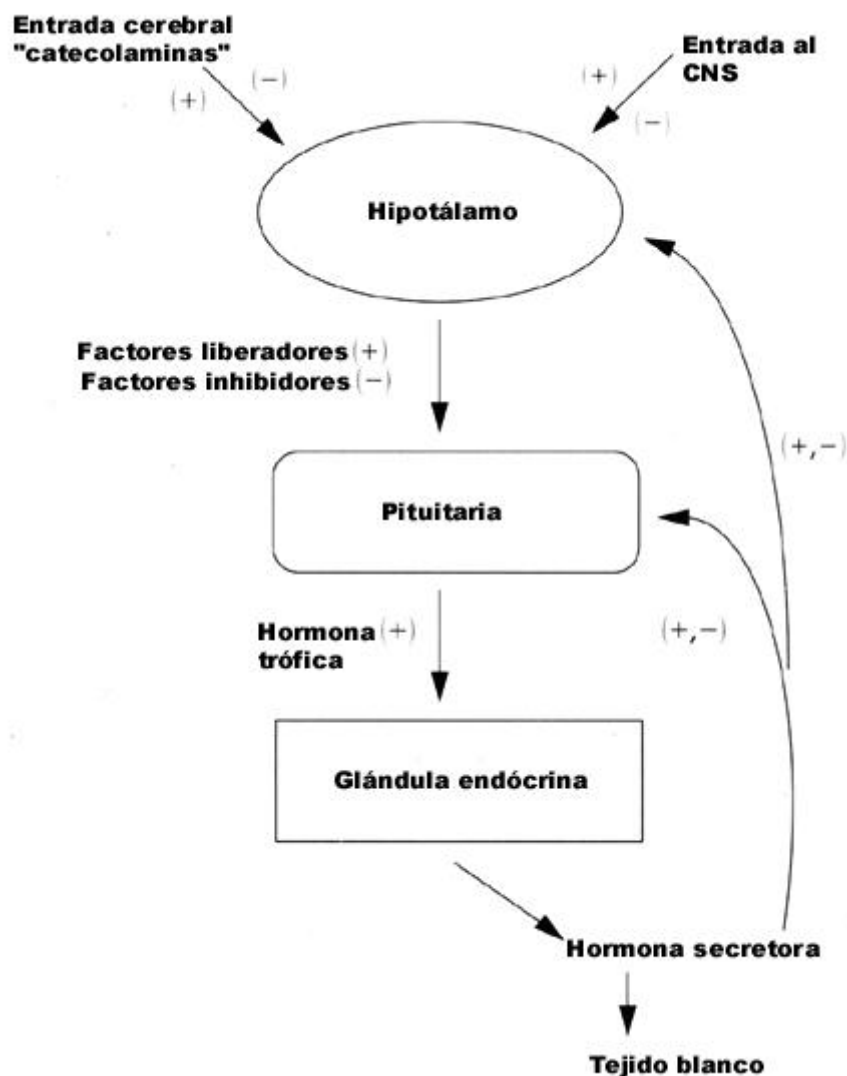


Figura 43-4 Regulación de retroalimentación del eje hipotálamo-pituitaria-órgano blanco. El hipotálamo recibe impulsos neurales y sensoriales para producir, factores e inhibidores peptídicos y liberación de hormonas en la pituitaria. La pituitaria responde liberando hormonas tróficas que actúan en glándulas y tejidos endocrinos específicos para producir síntesis y liberación de la hormona por la glándula primaria. La hormona secretada por el órgano endocrino produce un efecto de retroalimentación negativa hacia los altos centros de control para mantener un equilibrio de la homeostasis de la hormona en la circulación.

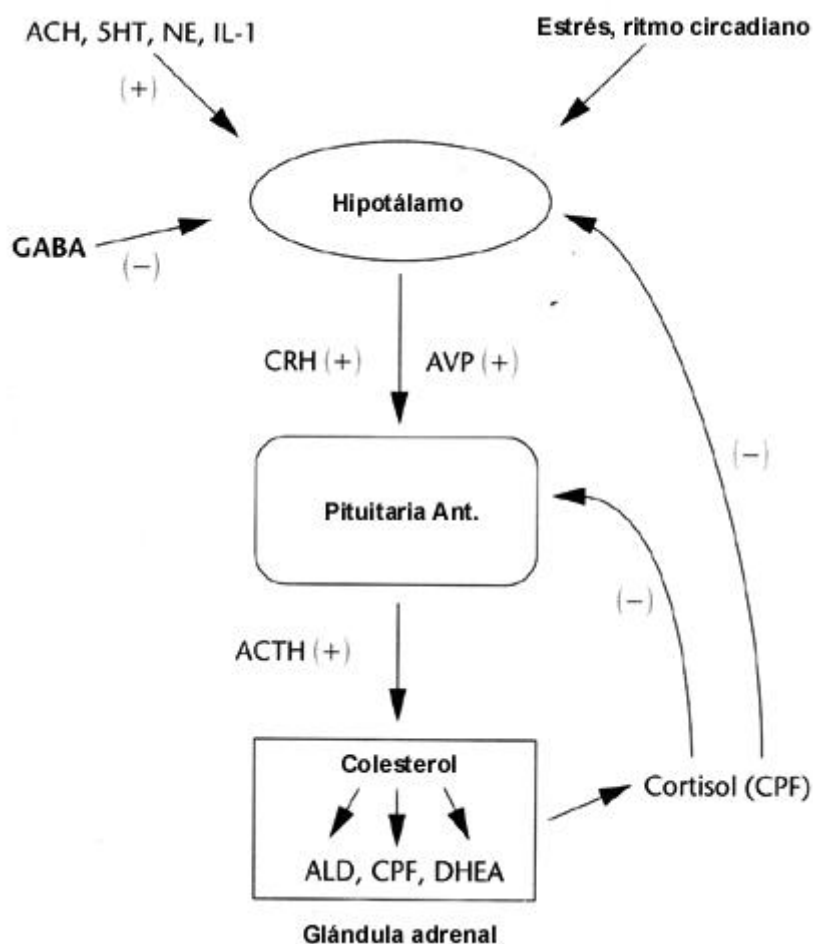


Figura 43-5 Mecanismos de regulación por retroalimentación del eje hipotálamo-pituitario-suprarrenal. Muchos neurotransmisores que incluyen la acetilcolinesterasa (ACH), 5 – hidroxitriptamina (5 HT), norepinefrina (NE) y la citoquina interleuquina 1 (IL-1) tienen un efecto positivo sobre la producción del factor liberador de corticotropina (CRH) por parte del hipotálamo. El ácido gama – aminobutírico (GABA) ejerce una influencia negativa. El estrés y el ritmo circadiano también estimulan la liberación de CRH. Ambos, el CRH y la arginina vasopresina (AVP) estimulan a la pituitaria para liberar hormona adrenocorticotrópica (ACTH) que a su vez ejerce una acción positiva sobre las glándulas suprarrenales para sintetizar y liberar las tres principales clases de hormonas (Aldosterona, ALD; Cortisol, CPF; y Dehidroepiandrosterona, DHEA). El cortisol es el único esteroide adrenal que ejerce retroalimentación negativa sobre el eje hipotálamo – pituitaria para controlar su propia velocidad de biosíntesis.

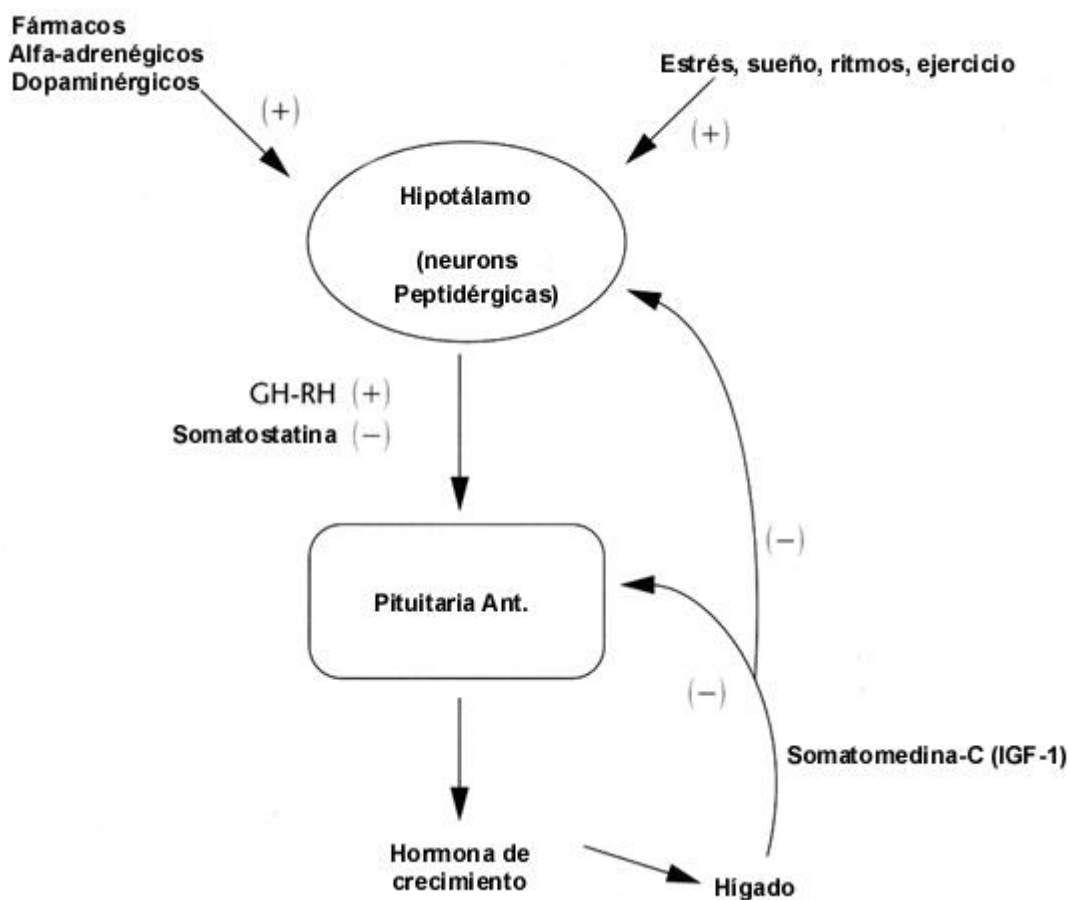


Figura 43-6 Mecanismo de retroalimentación del eje hipotálamo – pituitaria- hormona de crecimiento. La liberación de la hormona de crecimiento por parte de la pituitaria esta influenciada por el factor liberador de hormona de crecimiento (GH-RH) del hipotálamo. El hipotálamo se ve estimulado positivamente por drogas alfa adrenérgicas y dopaminérgicas, estrés, patrones de sueño y ejercicio. La hormona de crecimiento actúa en el hígado produciendo somatomedina C, o factor de crecimiento parecido a la insulina (IGF-1). Este a su vez retroalimenta negativamente el eje hipotálamo – pituitaria, para mantener el control homeostático sobre la secreción de hormona de crecimiento.

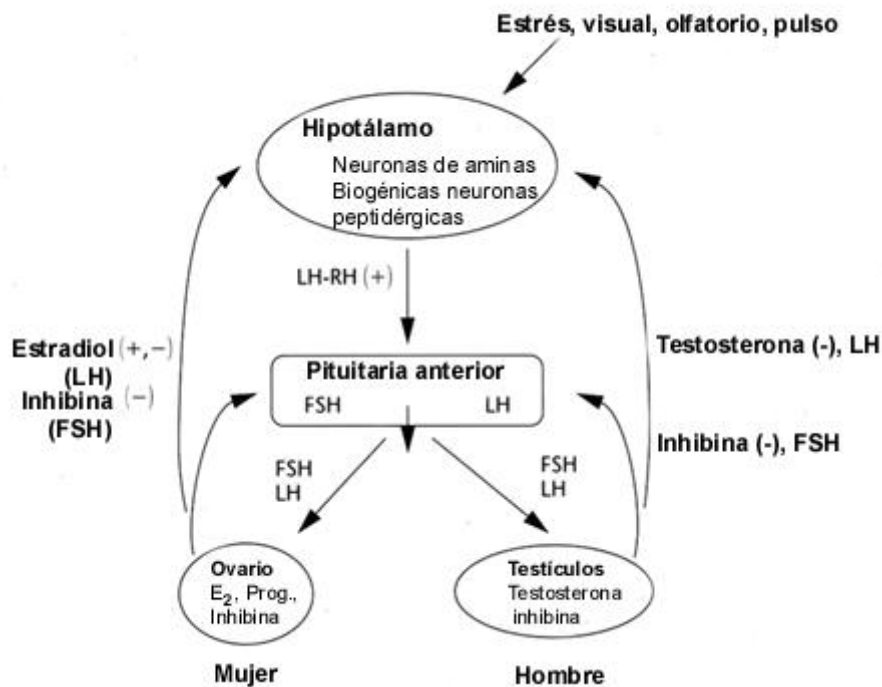


Figura 43-7 Mecanismo de retroalimentación del eje hipotálamo – pituitaria – gónada. Las aminas biogénicas y neuronas péptidérgicas del hipotálamo responden a la señal sensorial neural enviada por el cerebro, para producir el factor liberador de gonadotropinas (LH-RH). Esta estimulación puede ser visual u olfatoria en un patrón pulsátil. El estrés ejerce un efecto negativo sobre estos estímulos. El LH-RH actúa sobre la pituitaria para sintetizar y liberar la LH y FSH en mujeres, la FSH estimula el desarrollo ovárico y la producción del estradiol mientras que la LH provoca el desarrollo del cuerpo lúteo y la secreción de progesterona. El estradiol ejerce retroalimentación negativa y positiva sobre el eje hipotálamo – pituitaria para controlar el ciclo menstrual y la secreción de LH. El control de la FSH es regulado por un péptido ovárico llamado inhibina. En hombres la FSH causa espermatogénesis testicular mientras que la LH estimula la producción de testosterona en los testículos. La testosterona ejerce retroalimentación negativa sobre el eje hipotálamo – pituitaria para controlar la liberación de LH mientras que un péptido testicular la inhibina controla la liberación de FSH.

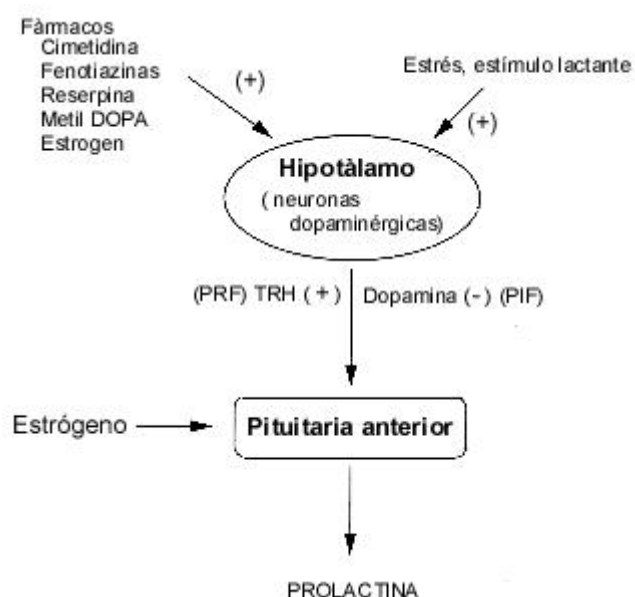


Figura 43-8 Mecanismo de retroalimentación para la secreción de prolactina. La liberación de prolactina en la pituitaria esta bajo un control inhibitorio derivado de la dopamina hipotálamica o factor inhibitorio de la prolactina (PIF). El factor liberador de tiotropina (TRH) a su vez estimula la producción de prolactina. La liberación de prolactina se afecta por muchos factores que influyen en la producción de dopamina; los fármacos, los estrógenos y el estrés son factores que causan un aumento en la secreción de prolactina. Los estrógenos sensibilizan la pituitaria para producir prolactina.

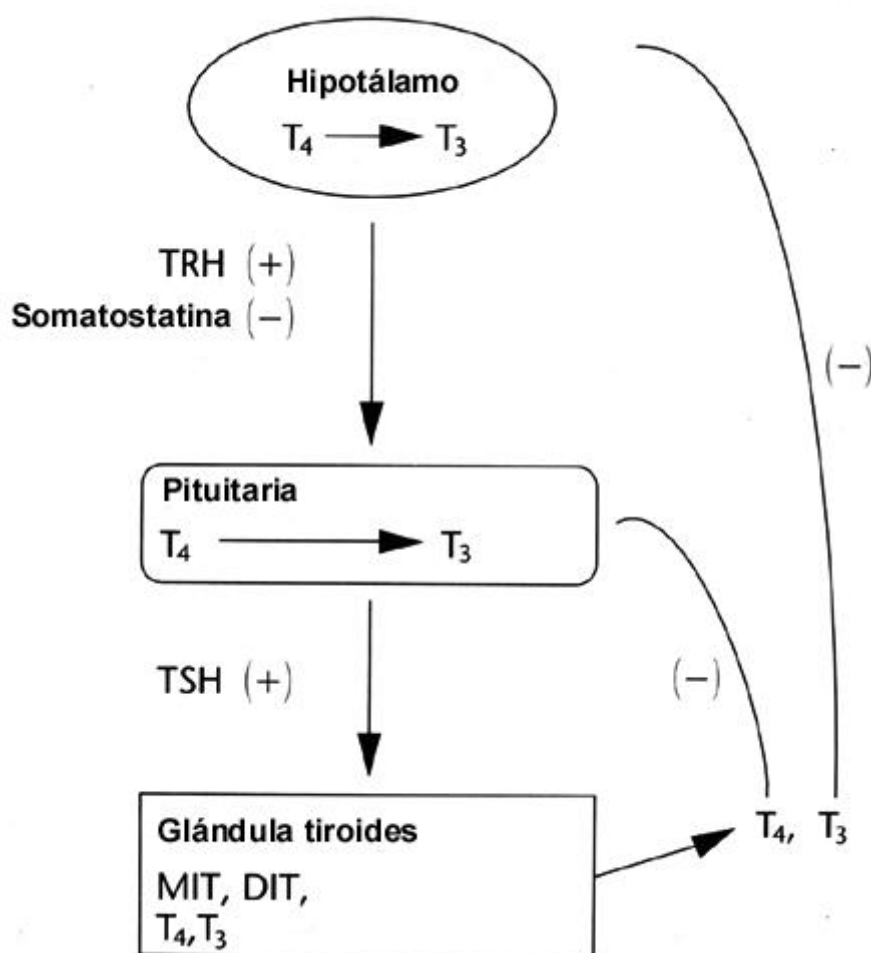


Figura 43-9 Mecanismo de retroalimentación del eje hipotálamo pituitario – tiroides. El hipotálamo secreta el factor liberador de tirotropina (TRH) para estimular la síntesis y liberación de TSH de la pituitaria. La TSH estimula a su vez a la glándula tiroides para crecer, vascularizarse y producir las hormonas tiroideas, tetrayodotironina (T_4) y triyodotironina (T_3). La T_3 se forma primariamente a partir de la conversión periférica del T_4 . El T_4 a través de la conversión hipotalámica y pituitaria en T_3 , y la T_3 directamente, ejercen una retroalimentación negativa en el eje hipotálamo – pituitaria para mantener el balance homeostático de las hormonas tiroideas circulantes.

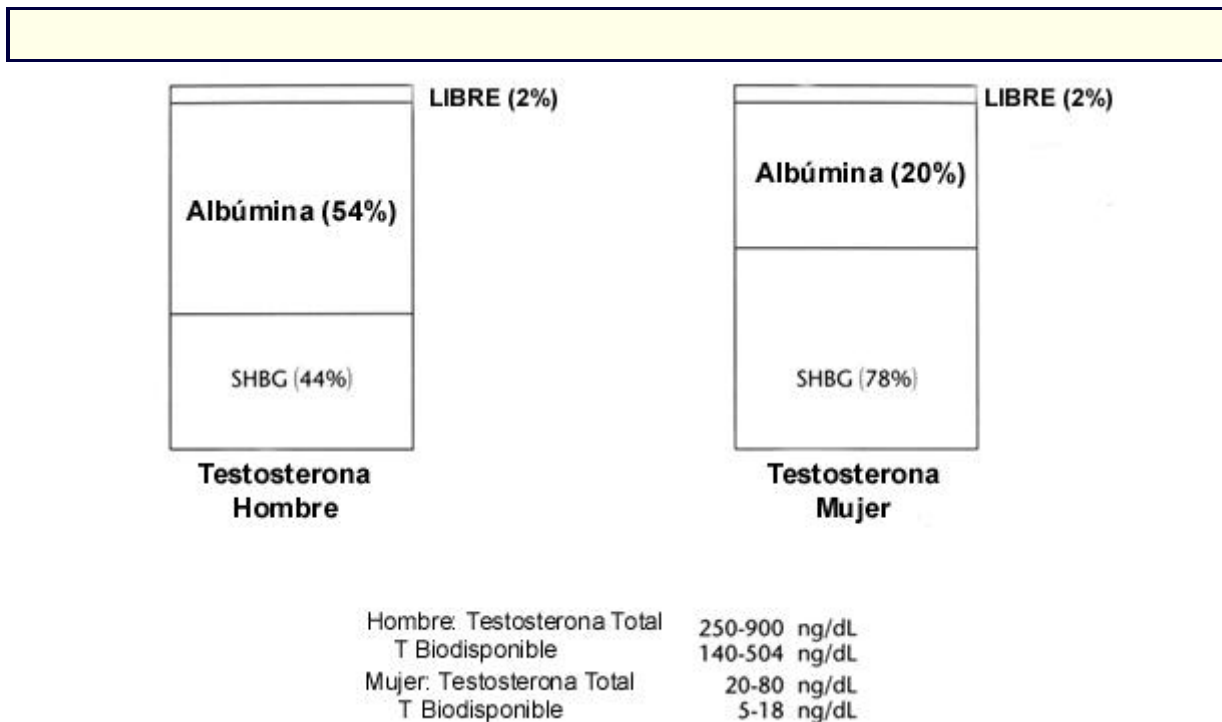


Figura 43-10 Testosterona libre y unida débilmente. La testosterona circula unida a dos proteínas, una específica, la globulina transportadora de hormonas sexuales (SHBG) y la albúmina. Solo una pequeña fracción de testosterona circula en estado libre. Los niveles de testosterona total son una combinación de la unida a la SHBG, la unida a la albúmina y la libre. La forma biodisponible de hormona circulante es la que se une a los receptores y está compuesta por la testosterona libre y la ligada a la albúmina y es la forma activa biológicamente encontrada en la circulación.

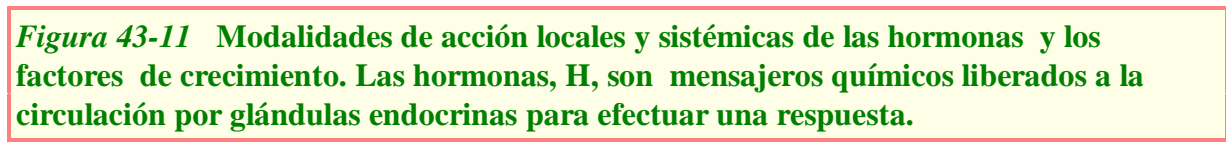
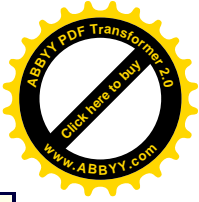




Figura 43-12 Sistema sinusoidal portal de la glándula pituitaria.

CAPÍTULO 44

44. La Tiroides

Mariano Fernández-Ulloa

Marvin H. Lucas

Anatomía

Fisiología de la tiroides

- Metabolismo del yodo y síntesis de las hormonas tiroideas
- Transporte de las hormonas tiroideas
- Metabolismo de las hormonas tiroideas
- Mecanismos de acción
- Control y regulación de la función tiroidea
- Interrelaciones entre la glándula tiroides y otras funciones
- Efectos metabólicos y fisiológicos generales de la hormona tiroidea
- Función tiroidea en las enfermedades no-tiroideas (ENT)

Condiciones patológicas

- Hipertiroidismo
- Hipotiroidismo
- Bocio
- Nódulo solitario
- Cáncer tiroideo

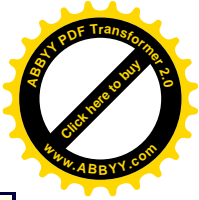
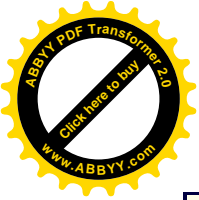
Resistencia periférica a la hormona tiroidea

Pruebas de la función tiroidea

- Incorporación de yodo por la tiroides
- Prueba de estimulación de la TRH
- Prueba de estimulación de la TSH
- Prueba de supresión de la triyodotironina (T3) o Citomel
- Prueba de descarga del perclorato

Alteraciones bioquímicas en estados patológicos

- Yodo fijado a proteína (YFP)
- T₄ sérica
- T₃ sérica



Niveles de hormona libre: mediciones directas e indirectas

Prueba de incorporación a resinas (IRT₃ o IRT₄)

Índice de la hormona tiroxina libre (IT₄L)

T₄ libre (T₄L) y T₃ libre (T₃L)

Globulina fijadora de tiroxina (GFT)

Hormona estimulante de la tiroides en suero (TSH)

Inmunoglobulinas

Hallazgos de laboratorio en enfermedades no-tiroideas (ENT)

Hallazgos de laboratorio después del tratamiento de enfermedades no-tiroideas

Métodos de análisis

Hormona estimulante de la tiroides (tirotropina)

Tiroxina

OBJETIVOS

- Describir la síntesis, transporte, función y regulación de las hormonas tiroideas.
- Describir las condiciones patológicas que resultan en hipertiroidismo o hipotiroidismo.
- Establecer la importancia del análisis de los niveles de hormona libre de T₄ y T₃ y el significado de la determinación de tiroxina libre.
- Describir las pruebas de la función tiroidea y qué compuestos analizados se utilizan.
- Establecer el valor diagnóstico de las siguientes pruebas de laboratorio en la evaluación de las condiciones tiroideas: T₄, T₃, IRT₃, ITL y TSH.

Términos clave

acción trófica Estimulación de la reproducción y del aumento de tamaño celular.

acromegalia Aumento de tamaño de las extremidades (especialmente manos y pies) causada por un aumento de secreción de la hormona hipofisiaria de crecimiento.

actividad adrenérgica Efectos farmacológicos y metabólicos provocados por la hormona epinefrina (adrenalina) o norepinefrina (noradrenalina).

agentes anabólicos Compuestos (usualmente andrógenos) que promueven la síntesis de nuevos tejidos.

andrógeno Sustancia natural o sintética (usualmente una hormona) capaz de producir efectos masculinizantes.

anticuerpo antimicrosomal Un anticuerpo contra la peroxidasa tiroidea, el antígeno principal contra los microsomas tiroideos.

aplasia Falta de desarrollo de un órgano.

bocio Aumento de tamaño de la glándula tiroides.

bocio multinodular Tiroides aumentada de tamaño que contiene numerosas induraciones superficiales y profundas.

calorigénesis Producción de calor y energía.

captación de yodo La capacidad de la glándula tiroides de secuestrar yodo en contra de un



gradiente de concentración.

carcinoma embrionario Tumor raro y sumamente maligno que se encuentra en los testículos y se origina a partir de las células germinales primitivas.

carcinoma medular (tiroides) Cáncer de las células C.

células C Células secretoras de calcitonina en la tiroides.

células C parafoliculares Células secretoras de calcitonina localizadas entre los folículos.

células foliculares Células productoras de hormona tiroidea organizadas en unidades de vesículas esféricas.

coloide tiroideo Material que se encuentra en el interior de los folículos tiroideos que contiene tiroglobulina y hormona tiroidea.

coriocarcinoma Tumor sumamente maligno que se origina en las células trofoblásticas del epitelio placentario.

corticosteroide Cualquier esteroide sintético o natural con acciones metabólicas similares a las producidas en la corteza de las glándulas suprarrenales.

cretinismo Estado hipotiroideo causado por la falta congénita de secreción de hormona tiroidea y caracterizado por un trastorno severo del desarrollo físico y mental.

disgenesia Desarrollo anormal o incompleto.

displasia Desarrollo anormal de un órgano que trae como consecuencia alteraciones en la configuración, tamaño u organización celular.

DYT Diyodotirosina.

efecto de Wolff-Chaikoff Disminución de la formación y liberación de hormona tiroidea en presencia de un exceso de yodo.

endémica Presente siempre en una región geográfica determinada.

endocitosis Incorporación del material que rodea a la célula mediante la invaginación de su membrana plasmática.

enfermedad de Graves Trastorno inmunológico provocado por anticuerpos fijados a los receptores de la hormona estimulante de la tiroides (TSH), que produce un aumento sin control de la síntesis y liberación de hormonas tiroideas.

estroma ovárico Tumor teratoide raro del ovario compuesto casi enteramente de tejido tiroideo.

facticio Producido por medios artificiales; sin intención.

globulina fijadora de tiroxina (GFT) Glucoproteína con movilidad alfa que transporta hormona tiroidea en la sangre.

gluconeogénesis Producción de azúcares a partir de sustancias no relacionadas con los carbohidratos.

hiperfunción Función aumentada de cualquier órgano o sistema.

hiperlipidemia Niveles aumentados de grasa en la sangre.

hipertiroidismo Estado clínico y metabólico provocado por un aumento de los niveles circulantes de hormona tiroidea activa.

hipofunción Disminución de la función de cualquier órgano o sistema.

hipoproteinemia Nivel disminuido de las proteínas en la sangre.

hipotiroidismo Estado clínico y metabólico provocado por una disminución del nivel circulante de hormona tiroidea activa o por un incremento de la resistencia tisular a la acción de las hormonas tiroideas; *primario*: disminución de la función tiroidea causada por



una enfermedad de la glándula tiroidea; *secundario*: disminución de la función tiroidea provocada por una enfermedad de la hipófisis; *terciario*: disminución de la función tiroidea provocada por una enfermedad a nivel del hipotálamo.

iatrogénico Cualquier condición adversa como consecuencia de tratamientos e intervenciones médicas.

incorporación tiroidea de yodo Porcentaje de yodo radiactivo acumulado en la tiroides después de la ingestión de una dosis conocida de radioisótopo.

intersticio Relativo a los espacios intercelulares de un tejido.

mixedema Estado de hipotiroidismo avanzado que se caracteriza clínicamente por un aspecto externo característico: palidez, edema (con abotagamiento) de la piel del rostro y las manos, apatía, etcétera.

mola hidatiforme Tumor intrauterino con proliferación epitelial anormal y cavitación del trofoblasto que se presenta como una masa con aspecto similar al de un quiste.

monoeliminación de yodo (monodesyodinación) Pérdida o eliminación de un solo átomo de yodo.

MYT Monoyodotirosina.

neonatal Período de tiempo comprendido entre el nacimiento y las 4 primeras semanas de vida.

nódulo solitario Aumento de tamaño localizado en una porción de la glándula tiroidea.

organificación Incorporación de la forma iónica del yodo en la estructura molecular de la tirosina.

parénquima Grupo de unidades celulares morfológicas y funcionales que constituyen un órgano.

porfiria Enfermedad caracterizada por una alteración del metabolismo de las porfirinas.

prohormona Compuesto que requiere una transformación química para convertirse en una hormona activa.

proteína fijadora competitiva Proteína que tienen la propiedad de fijar otra molécula, permitiendo a una molécula marcada competir con una molécula no marcada por el mismo sitio de fijación.

prueba de incorporación a resina Determinación del número de sitios de fijación disponibles a nivel de las proteínas plasmáticas transportadoras de hormona tiroidea.

iT_3 T_3 inversa: triyodotirosina con el yodo en posiciones 3, 3' y 5'.

síndrome de Cushing Grupo de alteraciones metabólicas y manifestaciones clínicas provocadas por una producción aumentada o por la administración de hormonas corticosteroideas.

síndrome de Down (mongolismo) Condición caracterizada por retardo mental y rasgos físicos característicos asociados con una anomalía cromosómica.

síndrome de Klinefelter Síndrome caracterizado por la presencia de testículos pequeños y atroficados, grados diversos de masculinización, esterilidad y anormalidades cromosómicas.

síndrome nefrótico Condición caracterizada por una pérdida aumentada de proteínas en la orina, disminución de la albúmina en sangre e incremento de la acumulación tisular de líquido (edema) provocado por diversas enfermedades que afectan los riñones.

termogénesis Producción de temperatura y energía.

tiroglobulina Glucoproteína con un peso molecular de 660,000 daltones producida por las



células foliculares y que contiene los precursores de T_3 y T_4 .

tiroiditis Término genérico que designa una inflamación de la glándula tiroides.

tiroiditis de Hashimoto Proceso inflamatorio de la glándula tiroides causado por una alteración del sistema inmunológico que puede o no conducir a una función tiroidea anormal.

tirototoxicosis Condición provocada por una secreción excesiva de hormona tiroidea, a menudo utilizada como sinónimo de hipertiroidismo.

tirotropina. Sinónimo de la hormona estimulante de la tiroides (TSH).

transtiretina Prealbúmina en plasma que transporta hormona tiroidea.

TRH (hormona liberadora de tirotropina) Tripéptido producido en el hipotálamo que promueve la liberación de TSH. Es conocida ampliamente bajo su abreviatura inglesa TRH por “thyroid-releasing hormone”.

tumor trofoblástico Tumor que se origina en las células extraembrionarias de naturaleza ectodérmica localizadas en el blastocito.

TSH Glucoproteína compuesta por subunidades alfa y beta que es liberada por la hipófisis y estimula la producción y liberación de hormona tiroidea. Se conoce ampliamente bajo su abreviatura inglesa TSH, por “thyroid-stimulating hormone”.

TSI Inmunoglobulina estimulante de la tiroides. Se conoce ampliamente por su abreviatura inglesa TSI por “thyroid-stimulating immunoglobulin.”

T_3 Hormona tiroidea con los tres átomos de yodo en las posiciones 3, 5 y 3' (triiodotironina).

T_4 (tiroxina) Hormona tiroidea con los cuatro átomos de yodo en posiciones 3, 5, 3' y 5'.

yodo fijado a proteínas (YFP) Cantidad total de yodo unido a las proteínas plasmáticas.

Anatomía

La tiroides está compuesta por dos lóbulos, uno a cada lado del cuello. La glándula tiroides está compuesta por dos tipos de células: foliculares y parafoliculares (Fig. 44-1). Las células foliculares están dispuestas en forma esférica en una hilera simple; poseen un extremo apical que se dirige hacia el centro del folículo y un extremo basal situado frente al intersticio. Las células foliculares producen hormona tiroidea, la cual ulteriormente es almacenada en la porción central del folículo en un material denominado “coloide”. El intersticio contiene el aporte sanguíneo y las células parafoliculares. Las células parafoliculares secretan la hormona calcitonina, por lo que se denominan células “C”.

Fisiología de la Tiroides

La glándula tiroides desempeña como función principal la producción y secreción de hormonas metabólicamente activas, esenciales para la regulación de diversos procesos metabólicos. Las hormonas tiroideas son producidas en el interior de las células de los folículos a partir del aminoácido tirosina y del elemento halógeno yodo. Las dos hormonas tiroideas más importantes son la tiroxina (T_4), la cual contiene 4 átomos de yodo, y la triiodotironina (T_3), que posee 3 átomos de yodo (Fig. 44-2).



Las hormonas tiroideas son liberadas del coloide y secretadas en la circulación en respuesta a la acción de la hormona hipofisiaria denominada *hormona estimulante de la tiroides* (TSH).

Metabolismo del yodo y síntesis de hormona tiroidea

El yodo es un componente natural de muchos alimentos, y en los Estados Unidos es provisto en cantidad adecuada mediante una dieta bien equilibrada. Usualmente se obtiene una cantidad extra de yodo como consecuencia de la ingestión de alimentos enriquecidos con yodo y de numerosos medicamentos que contienen yodo, como las “píldoras de vitaminas”.

La ingesta diaria de yodo varía ampliamente en las diferentes regiones geográficas. En los Estados Unidos, los rangos de ingesta oscilan entre 250 y 700 μg diarios o más. En países como el Japón, la ingesta puede llegar a ser de varios miligramos por día, mientras que en algunas regiones de África, Sudamérica, Asia y Europa, puede ser de solo 50 $\mu\text{g}/\text{día}$.

En condiciones fisiológicas, el yodo es reducido a la forma iónica yoduro (I^-) en el tubo digestivo y se absorbe en el intestino delgado, para luego ingresar a las vías excretoras o metabólicas (Fig. 44-3). El riñón excreta entre un 60 y un 80% del yodo ingerido. Una pequeña cantidad de yodo es excretado por vía intestinal. La excreción fecal deriva en gran parte de la degradación de hormonas a nivel hepático, las cuales son excretadas en el intestino a través del tracto biliar.^{ref(1812)} El resto del yodo se distribuye en los compartimentos extracelular y tiroideo. El compartimento del yodo intratiroideo contiene aproximadamente un 90% del yodo total del organismo y puede alcanzar cifras de hasta 6,000 a 12,000 μg . El compartimento extracelular contiene la mayor parte del resto del yodo extratiroideo, excepto por una cantidad pequeña aunque importante presente dentro de las células. El metabolismo del yodo está íntimamente relacionado con los procesos de génesis de las hormonas tiroideas.

Característicamente, el metabolismo intratiroideo del yodo se ha dividido en las siguientes fases: 1) captación del yodo por las células foliculares, 2) organificación o conversión a yodo orgánico, 3) acoplamiento, 4) almacenamiento, y 5) secreción (Fig. 44-4). Durante el proceso de captación las células tiroideas concentran el yodo en contra de gradientes químicos y eléctricos elevados, que requieren un mecanismo activo dependiente de energía a nivel de la membrana celular. Se cree que existe un sistema dependiente de adenosín trifosfato (ATP), que sería el responsable de este transporte de yodo a través de la membrana celular.^{ref(1813)}

Este mecanismo de captación del yodo ha sido utilizado durante muchos años en las pruebas clínicas para evaluar la función tiroidea. Se administra yodo radiactivo por vía oral y posteriormente se determina el grado de concentración de yodo en la glándula tiroides. La captación de yodo es afectada por diversos factores fisiológicos y farmacológicos. El factor más importante es la hormona tiroideo estimulante (TSH), la cual estimula la incorporación de yodo. El exceso de yodo inhibe su propio transporte, mientras que la deficiencia de yodo lo estimula. Los iones como el perclorato y el tiocianato inhiben el transporte de yodo.

El segundo paso en el metabolismo intratiroideo del yodo consiste en la “organificación”, proceso mediante el cual el yodo se incorpora a la hormona tiroidea.^{ref(1814)} Este yodo proviene del yodo atrapado y del proceso de eliminación de yodo intratiroideo que se genera a partir de los precursores almacenados en la hormona tiroidea. En la tiroides el yodo es oxidado en presencia de una enzima, peroxidasa, a una forma reactiva que luego se



combina con la proteína tiroglobulina.[ref\(1815\)](#)

La tiroglobulina es una glucoproteína con un peso molecular de aproximadamente 660,000 daltones. La tiroglobulina actúa como una matriz preformada que contiene 140 residuos de tirosina a los cuales se fija el yodo reactivo para formar monoyodotirosina (MYT) y diyodotirosina (DYT). Después de su formación se produce el acoplamiento enzimático de MYT y DYT para formar T_3 y T_4 acopladas a la tiroglobulina. Posteriormente, la tiroglobulina es liberada por las células al coloide folicular, donde se almacena.

Cuando la TSH estimula la tiroides se desencadena una serie de cambios bioquímicos y celulares que conducen a la producción y liberación de hormona tiroidea.[ref\(1816\)](#) Inicialmente, las partículas de coloide son englobadas por las células foliculares y digeridas por proteasas, liberando MYT, DYT, T_3 y T_4 de la matriz de tiroglobulina. La MYT y la DYT intracelulares son inmediatamente liberadas del yodo que contienen, y los yoduros resultantes son reusados en la síntesis subsecuente de hormonas tiroideas, mientras que la T_3 y la T_4 son resistentes a la eliminación de yodo y son secretadas como hormonas activas. La secreción diaria de hormonas tiroideas incluye aproximadamente de 80 a 100 μg de T_4 y 7 μg de T_3 . La tiroides también secreta una pequeña cantidad de T_3 inversa (iT_3).

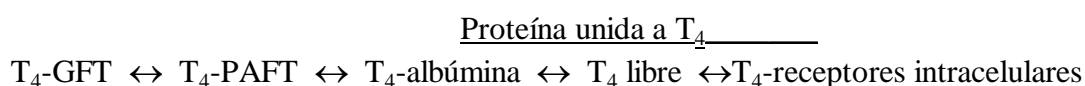
Transporte de las hormonas tiroideas

Después de ser liberadas en el torrente sanguíneo, las hormonas tiroideas son transportadas en dos formas: unidas a proteínas y libres. La forma libre de la hormona, que está disponible más fácilmente para la incorporación celular y es por lo tanto la fracción fisiológicamente activa, representa solo una pequeña fracción (menos del 1%) del contenido plasmático total de hormona tiroidea. La forma unida a las proteínas es metabólicamente inactiva y funciona como un reservorio estable de hormona, el cual en virtud de su magnitud y estado de equilibrio con el compartimento de la hormona libre ayuda a mantener una cantidad constante de hormona disponible para su utilización tisular.

La fijación de las hormonas tiroideas a las proteínas sanguíneas se lleva a cabo por tres proteínas plasmáticas.[ref\(1817\)](#) La más importante es la globulina fijadora de tiroxina (GFT), una glucoproteína con un peso molecular de 55,000 daltones que se sintetiza en el hígado. La segunda proteína en importancia es la prealbúmina fijadora de tiroxina (PAFT) también conocida como *transtiretina* y con un peso molecular de 50,000 daltones. La tercera proteína transportadora es la albúmina.

El papel de cada una de estas proteínas fijadoras en lo que respecta al transporte de T_3 y T_4 depende de sus afinidades relativas por cada una de las hormonas tiroideas y de sus concentraciones plasmáticas relativas. Casi toda la T_4 circulante (99.95%) se encuentra fijada a estas proteínas plasmáticas. Bajo condiciones fisiológicas la GFT transporta de 70 a 75% de la T_4 total. La PAFT y la albúmina transportan un 15 a 20% y 10% de T_4 , respectivamente. En forma similar a la T_4 , la mayoría de la T_3 plasmática (99.7%) circula en su forma unida. La afinidad de la GFT por la T_3 es menor que su afinidad por T_4 , por lo que la fijación de T_3 a la PAFT es mínima. La mayor parte de la T_3 está fijada a la GFT y en menor grado a la albúmina. La afinidad de la T_4 es diferente para cada una de sus proteínas plasmáticas y se debe contrastar con su afinidad por los receptores intracelulares de T_4 (ver adelante). La afinidad de T_4 por GFT es mayor que su afinidad por los receptores celulares de T_4 . La afinidad de T_4 por la albúmina es más débil que su afinidad por los receptores celulares de T_4 .

Por lo tanto existen tres clases de T_4 fijadas a proteínas con grados de afinidad decreciente. La primera con una afinidad alta y disponibilidad baja (GFT); la segunda con afinidad y disponibilidad intermedia (PAFT) y la tercera con baja afinidad y alta disponibilidad (albúmina). Esta situación permite el intercambio rápido de T_4 entre todos los compartimentos de acuerdo a la siguiente ecuación y asegura una disponibilidad constante de T_4 para las células efectoras:



Las alteraciones de las proteínas fijadoras pueden causar concentraciones anormales de hormona total (fijada a proteínas) en la sangre aun cuando existen niveles normales de la hormona libre. Los cambios en las concentraciones de GFT afectan los niveles totales de T_4 y T_3 en el suero. Los cambios en las concentraciones sanguíneas de GFT tienen un efecto indirecto en los mecanismos de retrocontrol negativo que regulan las hormonas tiroideas (Tabla 44-1). El incremento en los niveles de GFT causará un aumento en el nivel de hormona fijada a las proteínas que a su vez produce una baja de la hormona circulante. Este último evento inicia la secreción de TSH que a su vez causa un aumento y liberación de hormona tiroidea. Todos estos cambios son transitorios llegándose rápidamente a un nuevo estado de equilibrio con preservación del estado normal de la función tiroidea.

Metabolismo de las hormonas tiroideas

Las hormonas T_3 y T_4 circulantes se incorporan al reservorio intracelular, donde sufren una transformación parcial y ejercen sus efectos metabólicos o son degradadas y eliminadas por órganos excretores.

Toda la T_4 circulante se origina en la glándula tiroides que secreta de 80 a 100 μg de T_4 por día. La T_3 , que es más importante desde un punto de vista metabólico, se origina a partir de la secreción tiroidea directa ($\sim 20\%$) y de la conversión periférica de T_4 a T_3 , mediante una monoeliminación de yodo ($\sim 80\%$)⁵. La producción total diaria de T_3 oscila entre 22 y 47 μg . Se ha establecido que T_3 es la principal hormona activa a nivel celular. El papel desempeñado por la T_4 como hormona con actividad biológica directa está en debate y muchos investigadores consideran a la T_4 como una prohormona. Sin embargo la T_4 ejerce un cierto grado de actividad biológica directa, aunque menor que la actividad de la T_3 .

Se cree que las hormonas tiroideas son metabolizadas a través de mecanismos de eliminación de yodo y de mecanismos no desyodativos. Los siguientes representan algunos de los pasos metabólicos más importantes (Fig. 44-5).

1. Tanto la T_4 como la T_3 ejercen sus efectos biológicos mediante la fijación a nivel de receptores celulares específicos y ulteriormente son degradadas mediante procesos sucesivos de eliminación de yodo.
2. La eliminación de yodo es responsable de un 80 a un 85% del metabolismo de T_4 y T_3 .
3. Aproximadamente un 35 a un 50% de la T_4 que sufre un proceso de eliminación de yodo es convertida a T_3 .[refs\(1818\)](#)
4. Aproximadamente un 50 a un 65% de la T_4 a la que se le removió el yodo es

convertida a iT_3 .[ref\(1819\)](#)

5. La mayor parte de T_4 , T_3 e iT_3 se metabolizan a través de eliminaciones de yodo sucesivas, lo que produce la formación de metabolitos intermedios yodados y en última instancia de tironina.
6. Tanto la T_4 como la T_3 sufren procesos de desaminación y descarboxilación oxidativa de los residuos de alanina para formar los análogos del ácido acético: tetrac y triac.[ref\(1820\)](#)
7. Pequeñas cantidades de T_4 libres son eliminadas a través de la bilis y de la orina.
8. Pequeñas cantidades de T_3 e iT_3 e indirectamente de T_4 son metabolizadas a través de procesos de conjugación con el ácido glucorónico y con sulfato.

La conversión de T_4 a T_3 por monoeliminación de yodo es una de las vías metabólicas más importantes de T_4 . En la T_3 , los átomos de yodo están ubicados en las posiciones 3 y 5 del anillo interno (no fenólico) y en la posición 3' del anillo externo (fenólico) (ver Fig. 44-2). Se han identificado dos tipos de 5'-deyodasas. El tipo 1 de 5'-deyodasa mantiene la concentración plasmática de T_3 y se encuentra en el hígado y los riñones. Su actividad aumenta en el hipertiroidismo y disminuye en el hipotiroidismo. La actividad de la enzima de tipo 1 está disminuida en enfermedades severas, ayuno prolongado, y en enfermedad hepática severa. La actividad de la enzima de tipo 1 también está reducida en la etapa fetal así como en respuesta a medicaciones como el propiltiouracilo (PTU), propranolol, y exceso de glucocorticoides. El tipo 2 de 5'-deyodasa ayuda a mantener las concentraciones tisulares de T_3 . Esta enzima está bajo el control noradrenérgico y se encuentra predominantemente en el cerebro, la pituitaria, placenta, y el tejido adiposo oscuro. Su actividad aumenta en el hipotiroidismo, lo cual ayuda a mantener un nivel constante de la T_3 intracelular y disminuye en el hipertiroidismo como mecanismo compensatorio. Las cantidades de las dos 5'-yodasas pueden disminuir a causa de la administración de yodo en materiales radiológicos de opacificación o como consecuencia de la medicación con amiodarona, un antiarrítmico que inhibe la monoeliminación de yodo de la T_4 . La eliminación de yodo del anillo interno de la T_4 produce la T_3 inversa (iT_3), que es metabólicamente inactiva. En la iT_3 , los átomos de yodo se encuentran en la posición 3 del anillo interno y las posiciones 3' y 5' del anillo externo. Casi toda la iT_3 proviene de la monoeliminación de yodo del anillo interno de la T_4 .

Mecanismos de Acción

Los mecanismos de acción de las hormonas tiroideas a nivel celular han sido objeto de una amplia investigación. Inicialmente la hormona tiroidea parece que se fija a receptores en las membranas celulares, las cuales atraviesa por difusión directa. Dentro de la célula, las hormonas tiroideas se fijan al citosol y a receptores nucleares. Los receptores nucleares para la T_3 son productos genéticos del protooncogene c-erb A. Se cree que las mutaciones a nivel de estos receptores son la causa de la resistencia familiar a la hormona tiroidea. Después que la T_3 se fija a los receptores nucleares, se produce ácido ribonucleico mensajero (mRNA), el cual controla la síntesis de proteínas y enzimas responsables de sus funciones metabólicas.[ref\(1821\)](#) Otros mecanismos de acción a nivel celular que han sido postulados incluyen: 1) activación mitocondrial, 2) estimulación de la ATPasa dependiente de Na y K,[ref\(1822\)](#) 3) estimulación de las funciones de la membrana celular, probablemente a través de un receptor específico, y 4) interacción con el sistema adrenérgico.



Control y regulación de la función tiroidea

Eje hipotálamo-hipófisis-tiroides (EHHT).

El eje hipotálamo-hipófisis-tiroides comprende un grupo de órganos exocrinos y neuroexocrinos fisiológicamente interrelacionados que regulan y controlan la secreción de hormona tiroidea (Fig. 44-6). El efector final de este eje es la glándula tiroides, la cual se encarga de producir, almacenar y secretar las hormonas tiroxina y triyodotironina. El hipotálamo, que forma parte de la porción diencefálica del cerebro, ejerce importantes funciones reguladoras (ver capítulo 43).

La hormona liberadora de la tirotropina (TRH) es un tripéptido producido en el hipotálamo y secretado en el sistema venoso que conecta esta porción del cerebro con la hipófisis anterior. La TRH se une a receptores en la hipófisis, donde induce un aumento de la producción y secreción de hormona estimulante de la tiroides (TSH). La TSH es un glucopéptido estructuralmente compuesto de dos subunidades: alfa y beta. La subunidad beta confiere a la TSH las propiedades fisiológicas específicas que la diferencian de otros glucopéptidos hipofisiarios. La TSH es liberada de la hipófisis a la circulación sanguínea, a través de la cual llega a la glándula tiroides. A nivel de la tiroides, la TSH se fija a receptores específicos en la membrana celular donde estimula la adenil ciclasa y aumenta los niveles intracelulares del adenosín monofosfato cíclico (AMPc). El aumento de AMPc tiene dos efectos, el primero consiste en un efecto trófico con estimulación de la reproducción y el crecimiento celular. El segundo consiste en la estimulación de la producción y secreción de hormona tiroidea por las células tiroideas.

En individuos normales, un aumento de los niveles sanguíneos de TRH afecta los niveles sanguíneos de TSH y de hormona tiroidea. Después de la administración intravenosa de TRH sintética, los niveles sanguíneos de TSH comienzan a aumentar dentro de los siguientes 10 minutos, alcanzan un máximo a los 15- 45 minutos y se normalizan entre 1 y 4 horas.[ref\(1823\)](#)

El aumento de la TSH después de varias horas de la administración de TRH produce un incremento de los niveles séricos de T_4 y T_3 . El aumento inicial de T_3 es mayor (un incremento del 75% por encima de los valores basales) que el incremento de T_4 (de 15 a 50% por encima de los valores basales). Luego, los niveles de T_4 y T_3 descienden lentamente. Las respuestas de TSH (y ocasionalmente de T_4 y T_3) a la administración intravenosa de TRH sintética son utilizadas ocasionalmente con objetivos diagnósticos (ver pág. 881).

Efecto del sistema de retroinhibición sobre la secreción hipofisiaria de TSH.

El incremento de los niveles sanguíneos de hormonas tiroideas determina una inhibición de la secreción de TSH a nivel hipofisiario (mecanismo llamado de retrocontrol negativo). El mecanismo de este efecto inhibitor parece involucrar a la T_4 y a la T_3 circulantes en forma libre. La hipófisis y el hipotálamo también son capaces de convertir directamente a la T_4 en T_3 . Esta T_3 , generada localmente, actúa luego junto con la T_3 circulante en la hipófisis para inhibir la secreción de TSH en respuesta a la TRH. En el hipotálamo la T_3 reduce la producción de TRH. En contraste, la presencia de niveles reducidos de hormonas tiroideas provoca un aumento de la secreción de TRH y TSH.



Otros factores que afectan la función tiroidea.

La función tiroidea está regulada delicadamente por mecanismos extrínsecos e intrínsecos. Un mecanismo extrínseco directo está representado por el eje hipotálamo-hipófisis-tiroides (EHHT). Los mecanismos extrínsecos indirectos abarcan una gama de factores colaterales de naturaleza neurogénica, metabólica y farmacológica que ejercen efectos estimulantes e inhibidores centrales a todos los niveles del EHHT y periféricos sobre el metabolismo de las hormonas tiroideas (ver adelante). Los mecanismos intrínsecos son aquellos que tienen lugar en el interior de las células tiroideas asegurando que se produzcan las cantidades adecuadas de hormona intratiroidea. Estos mecanismos dependen esencialmente de la disponibilidad y los efectos del yodo. Cuando la tiroides es expuesta a incrementos rápidos e importantes de yodo se observa una disminución de la formación y liberación de hormona tiroidea. Este efecto inhibidor agudo del exceso de yodo es conocido como “efecto de Wolff-Chaikoff.” [ref\(1824\)](#) Si la tiroides continúa exponiéndose a incrementos en la concentración de yodo, ocurre una disminución y finalmente la suspensión de los efectos inhibidores del exceso de yodo sobre la formación y liberación de hormona tiroidea. [ref\(1825\)](#)

Efectos de fármacos y de otros compuestos sobre la función tiroidea.

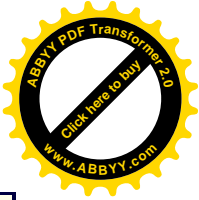
Diversos fármacos y sustancias pueden interferir en la función tiroidea. Los efectos farmacológicos pueden llevarse a cabo en diferentes niveles (Tabla 44-2). Por ejemplo la droga *amiodarona* causa un aumento de la T_4 total, la T_4 libre y la iT_3 , así como la disminución de la T_3 . [ref\(1826\)](#) Otras sustancias afectan los niveles de GFT y su capacidad fijadora, y por lo tanto afectan la cantidad de T_3 y T_4 en la sangre, como se muestra en el siguiente cuadro.

Causas de las anormalidades en la globulina fijadora de tiroxina (GFT)

Cuantitativas

Aumento de los niveles séricos de GFT

- Embarazo
- Terapia de estrógenos
- Tratamiento de clofibrato
- Anticonceptivos orales
- Perfenazina
- Abuso de heroína o metadona
- Hepatitis aguda
- Hipotiroidismo
- Período neonatal
- Porfiria aguda intermitente
- Exceso de GFT genética



Disminución de los niveles séricos de GFT

- Andrógenos
- Agentes anabólicos
- Cirrosis
- Enfermedad aguda
- Estrés quirúrgico
- Enfermedad crónica grave
- Hipoproteinemia grave
- Desnutrición proteica
- Síndrome nefrótico
- Hipertiroidismo
- Terapia de corticosteroides
- Terapia de L-asparaginasa`
- Acromegalia activa
- Síndrome de Klinefelter
- Síndrome de Cushing
- Síndrome de Down
- Hiperlipidemia de tipo III
- Acidosis metabólica crónica
- Deficiencia genética (generalmente asociada al cromosoma

X)

Cualitativas

Genéticas

Aumento de la afinidad de unión genéticamente determinada

Disminución de la afinidad de unión genéticamente determinada

Medicamentos que compiten con T4 y T3 por sitios de unión a GFT

- Fenitoína (difenilhidantoína, Dilantin)
- Dicumarol
- Heparina
- Atromid S
- Aspirina
- Fenilbutazona

Interrelaciones entre la glándula tiroides y otras funciones

Existen varios factores fisiológicos que influyen indirectamente sobre la función tiroidea y en los efectos de sus hormonas. Los efectos de las hormonas sexuales y el sexo sobre la función tiroidea son variables. Se sabe que las enfermedades tiroideas predominan en las mujeres. Los estrógenos provocan un incremento del nivel de GFT y por lo tanto de los

valores séricos totales de T_3 y T_4 , mientras que las hormonas androgénicas ejercen un efecto opuesto. Por otra parte, los estados de disminución (hipotiroidismo) e incremento (hipertiroidismo) de la función tiroidea se asocian con alteraciones del aparato reproductor, anormalidades del ciclo menstrual, pubertad precoz o retardada, esterilidad y retardo del crecimiento.

La edad también afecta a la función tiroidea. El neonato posee niveles de T_3 más reducidos y niveles de T_4 e iT_3 más elevados que los observados en el adulto.^{ref(1827)} Inmediatamente después del nacimiento se produce un incremento de la TSH, con una elevación correspondiente de los niveles de T_3 y T_4 , que alcanza su valor máximo el segundo día de vida. Estos niveles elevados de T_3 y T_4 disminuyen gradualmente hasta alcanzar los niveles normales detectados en el adulto, que ocurre al finalizar el primer año de vida. También se observa una declinación progresiva de los niveles de T_3 en los adultos durante el proceso de envejecimiento. Durante el embarazo es posible observar alteraciones notables de la función tiroidea. (ver capítulo 40). La placenta normal produce una cantidad significativa de hormonas no-tiroideas, (especialmente estrógenos) las cuales estimulan la síntesis, y por lo tanto, la elevación de los niveles de GFT. Durante el embarazo aumentan los niveles de T_4 total y, en menor grado, de T_3 total como consecuencia del incremento de la GFT.^{ref(1828)} El estrés y el ayuno también afectan la función tiroidea. En los estados de ayuno prolongado se observan alteraciones de los niveles séricos de hormona en las siguientes 24 a 48 horas. Inicialmente se observa una disminución rápida de T_3 , la cual prosigue más lentamente si se mantiene el ayuno. La disminución de los niveles de T_3 es causada por una reducción de la conversión periférica de T_4 a T_3 . De manera concomitante, se observa un incremento de los niveles de iT_3 . La disminución crónica de la ingestión calórica también trae como consecuencia una reducción del nivel de prealbúmina fijadora de tiroxina (PAFT), probablemente debido a una disminución en la producción hepática.

Efectos metabólicos y fisiológicos generales de la hormona tiroidea

El aumento o la disminución de la producción hormonal se refleja en estados de hiperfunción (hipertiroidismo) e hipofunción (hipotiroidismo), respectivamente. La presentación clínica del hipertiroidismo y del hipotiroidismo es el resultado de las acciones o falta de los efectos básicos de las hormonas tiroideas sobre los diversos órganos y sistemas metabólicos.

La Tabla 44-3 describe algunos de los efectos generales de las hormonas tiroideas sobre diversas funciones metabólicas y sistemas orgánicos. Los efectos de la hormona tiroidea se pueden dividir de acuerdo con sus expresiones clínicas de la siguiente manera: 1) efectos metabólicos generales, 2) efectos sobre la maduración y el crecimiento, y 3) efectos específicos por órgano. En términos generales, tanto el metabolismo intermediario como los metabolismos específicos son estimulados por la hormona tiroidea y como consecuencia se produce un incremento del consumo de oxígeno y de la termogénesis. La hormona tiroidea ejerce importantes funciones como promoción de la diferenciación, crecimiento, y maduración celular. La deficiencia de hormona tiroidea en una fase temprana de la vida produce severos trastornos del crecimiento físico, de la maduración, y del desarrollo cerebral. La tercera clase de efectos está constituida por las acciones directas que las hormonas tiroideas ejercen sobre diversos órganos y sistemas específicos. Finalmente, el incremento de la función tiroidea se

asocia a un estado hipersimpático (hiperadrenérgico) importante en la génesis de algunos de los síntomas del hipertiroidismo. La disminución de hormona tiroidea genera el depósito de mucoproteínas y de mucopolisacáridos en diversos tejidos como la piel, músculos y corazón. Este fenómeno explica parcialmente el engrosamiento cutáneo, la debilidad muscular, la hipertrofia cardíaca, y los síntomas de insuficiencia cardíaca observados en los pacientes hipotiroideos.

Función tiroidea en las enfermedades no-tiroideas (ENT)

Existe un grupo de condiciones que no alteran directamente la secreción hormonal a nivel tiroideo sino que más bien interfieren con el transporte y el metabolismo normales de las hormonas tiroideas. Estas condiciones determinan alteraciones en las pruebas sanguíneas estándares de función tiroidea (ver Tabla 44-3), pero generalmente no se acompañan de una verdadera disfunción tiroidea. Estos trastornos son de importancia clínica debido a que pueden simular una enfermedad tiroidea o generar confusión diagnóstica en pacientes con disfunción tiroidea.

La desnutrición y las alteraciones de la función renal y la función hepática representan los tres factores extratiroideos más importantes capaces de conducir a anormalidades de las pruebas de función tiroidea. A menudo se ven estados de desnutrición en casos de enfermedades debilitantes. La anormalidad fisiológica principal en pacientes desnutridos consiste en una disminución de la conversión periférica de T_4 a T_3 .^{ref(1829)} Como resultado, las concentraciones séricas de T_3 total y T_3 libre disminuyen significativamente mientras que la concentración de T_4 total permanece estable. Los niveles de iT_3 pueden llegar a duplicarse.

El hígado desempeña un papel importante en el metabolismo de las hormonas tiroideas debido a su papel en la conversión de las proteínas de T_4 a T_3 o $r T_3$ y la depuración de las hormonas tiroideas. En los casos de enfermedad hepática puede producirse una alteración de estas funciones con la aparición de anormalidades de las pruebas funcionales a pesar de la ausencia de una enfermedad tiroidea.

Los riñones ejercen dos funciones principales en relación con la tiroides. La primera se relaciona con el metabolismo del yodo, dado que los riñones representan una de sus vías principales de eliminación. La segunda función consiste en evitar la pérdida excesiva de globulinas fijadoras de tiroxina por la orina. Las enfermedades renales pueden provocar una disminución de la depuración y la excreción del yodo con incrementos secundarios de las reservas sanguínea e intersticial de yodo, como se observa en la insuficiencia renal o en el aumento en la pérdida de proteínas fijadoras de tiroxina, que se presenta en el síndrome nefrótico. Finalmente, aunque con un menor grado de importancia en relación con el hígado, el riñón también ejerce la función metabólica de conversión de T_4 en T_3 . En pacientes con enfermedades agudas y severas los siguientes cambios pueden verse en el suero: 1) un nivel no detectable de T_3 , 2) un marcado descenso de T_4 , y 3) niveles de TSH normales o medianamente reducidos. A medida que el paciente se recupera la TSH aumenta hasta que se normalicen T_4 y T_3 libres en el suero.

Condiciones Patológicas

Hipertiroidismo.

Causas.

El hipertiroidismo designa el síndrome clínico provocado por un exceso de hormona tiroidea activa circulante. Es causado por condiciones patológicas múltiples y heterogéneas cuyo común denominador consiste en un incremento de los niveles circulantes de hormona tiroidea (ver el siguiente cuadro).

Causas de hipertiroidismo	
Hipertiroidismo primario	
Anormalidades primarias de la tiroides	
Bocio tóxico multinodular (enfermedad de Plummer)	
Adenoma tiroideo	
Carcinoma tiroideo	
Estroma ovárico (teratoma ovárico con tejido tiroideo)	
Hipertiroidismo secundario	
<i>Endógeno:</i> incremento en los niveles séricos de TSH o de sustancias estimulantes de la tiroides, causando hiperactividad tiroidea:	
Enfermedad de Graves	
Hipertiroidismo neonatal	
Tumores hipofisarios (secretore de TSH)	
Tumores trofoblásticos	
Mola Hidatiforme	
Coriocarcinoma	
Carcinoma embrionario	
de los testículos	
<i>Exógeno:</i>	
Iatrogénico	
Hipertiroidismo facticio	
Tiroiditis	
Tiroiditis subaguda (fase inicial)	
Tiroiditis linfocítica (Hashimoto)	
Tiroiditis por radiación	
Tiroiditis puerperal	

La enfermedad de Graves es causada por un trastorno inmunológico en el cual los anticuerpos séricos se fijan a los receptores de la TSH a nivel de la célula tiroidea y estimulan la producción y la liberación de hormona tiroidea. Estos anticuerpos conforman un grupo



heterogéneo de inmunoglobulinas séricas que pertenecen a la fracción IgG y son denominadas genéricamente *inmunoglobulinas estimulantes de la tiroides* (IET), [ref\(1830\)](#) debido a su capacidad de estimular la función de las células tiroideas. El anticuerpo estimulante de la tiroides de acción prolongada (ETLD) fue la primera IET descrita. El ETLD se encuentra presente en aproximadamente un 60% de pacientes con enfermedad de Graves.

La enfermedad de Graves se caracteriza clínicamente por la presencia de un bocio (agrandamiento de la tiroides) difuso, síntomas y signos de hipertiroidismo (Tabla 44-3), oftalmopatía, y ocasionalmente edema pretibial. La oftalmopatía de Graves se caracteriza por una infiltración mixedematosa de los tejidos y músculos orbitarios, lo que trae como consecuencia una proyección externa de los globos oculares y una disfunción de los músculos oculares. La oftalmopatía puede existir en ausencia de hiperfunción tiroidea concomitante.

El bocio multinodular tóxico es una causa frecuente de hipertiroidismo y usualmente aparece en pacientes con bocios nodulares preexistentes. En los bocios multinodulares, algunas porciones de tejido tiroideo escapan del control normal del mecanismo de inhibición, se vuelven autónomas y secretan hormona tiroidea en exceso. Esta condición se observa más frecuentemente en pacientes de edad avanzada y no se acompaña de oftalmopatía ni de edema pretibial.

Los adenomas tiroideos son tumores benignos que ocasionalmente producen un exceso de hormona tiroidea. A diferencia del tejido tiroideo normal, los adenomas pueden no estar afectados por cambios de los niveles séricos de TSH y pueden comportarse como un tejido autónomo. Los pacientes con adenomas presentan nódulos tiroideos que concentran ávidamente el yodo radiactivo (nódulos calientes). Debe destacarse que la mayoría de los adenomas no causan hiperfunción tiroidea. El cáncer tiroideo como causa de hipertiroidismo es raro. El término “tiroiditis” es utilizado genéricamente para describir una inflamación de la tiroides. Todas las formas de tiroiditis son potencialmente capaces de provocar hipertiroidismo mediante la liberación de cantidades grandes de hormona de los folículos inflamados o disueltos. Se considera que la tiroiditis subaguda es causada por una infección viral de la tiroides y evoluciona a través de dos fases. La fase temprana se caracteriza por una inflamación activa de la tiroides, que trae como consecuencia un aumento del tamaño con dolor local asociado a un cuadro clínico y de laboratorio de hiperfunción tiroidea, provocado por la liberación de hormona tiroidea. [refs\(1831\)](#) Durante la fase tardía se observa usualmente una recuperación del paciente con una normalización funcional. Algunos pacientes pueden evolucionar a través de un estado intermedio de hipotiroidismo. La tiroiditis linfocítica crónica (tiroiditis de Hashimoto) puede asociarse ocasionalmente con un estado de hiperactividad tiroidea, pero más a menudo resulta en un hipotiroidismo.

La tiroiditis del posparto ocurre en 3.9% a 8.2% de las mujeres. [refs\(1832\)](#) Puede tener tres fases con una etapa inicial caracterizada por un hipotiroidismo sin dolor local y disminución importante de los valores de la prueba de captación de yodo. Típicamente, empieza de 1 a 3 meses después del parto y dura entre 1 y 2 meses. [ref\(1833\)](#) A menudo, la tiroides está agrandada. La paciente puede desarrollar hipotiroidismo antes de recuperarse. Los síntomas comunes incluyen debilidad general y depresión. Se cree que la tiroiditis del posparto es causada por una alteración inmunológica lo cual explica la presencia ocasional de anticuerpos antitiroideos. [ref\(1834\)](#) La hiperfunción tiroidea provocada por la tiroiditis debida a radiación es usualmente leve y autolimitante, como lo indican las elevaciones de T_4 y T_3 en suero. El hipertiroidismo exógeno es provocado por la administración de una cantidad

excesiva de hormona tiroidea. Esta situación se observa como complicación de la terapia de reemplazo de hormona tiroidea llevada a cabo por el médico (iatrogénico) o como resultado de la ingestión oculta de hormona tiroidea por los pacientes (facticia).

Los tumores que se originan en el trofoblasto o capa celular externa del embrión en formación pueden producir una gran cantidad de gonadotropina coriónica humana (GCh). Esta hormona ha demostrado poseer una acción estimulante leve de la tiroides. Por lo tanto, estos tumores pueden causar una secreción aumentada de hormonas tiroideas. El hipertiroidismo provocado por tumores hipofisarios que secretan niveles elevados de TSH es un fenómeno raro. Algunos pacientes con deficiencia de yodo desarrollan hipertiroidismo después del reemplazo del yodo a través de la dieta o después de la administración de material de opacificación radiológica. Esta situación es llamada fenómeno de Yod-Basedon y se cree que ocurre en pacientes con enfermedad oculta de Graves o bocio multinodular.

Hallazgos de laboratorio.

La enfermedad de Graves afecta al 0.4% de la población en Estados Unidos y representa el clásico ejemplo de hipertiroidismo. Las anormalidades de laboratorio halladas en esta enfermedad se observan en la Tabla 44-4. Como se puede notar, las pruebas anormales incluyen: 1) elevación de las hormonas tiroideas en el suero; 2) disminución de los niveles séricos de TSH, y 3) disminución de las respuestas a la acción de la TRH. (ver pág. 881). Además, los pacientes con enfermedad de Graves pueden mostrar niveles séricos elevados de tiroglobulina y de inmunoglobulina estimulante de la tiroides. En general la T_3 está sumamente más elevada que la T_4 .

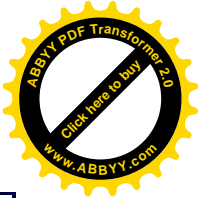
Hasta en un 5% de los pacientes con enfermedad tiroidea se puede observar un síndrome con síntomas de hipertiroidismo, y concentraciones normales de T_4 total y T_4 libre, una incorporación tiroidea de yodo radiactivo normal o ligeramente elevada y una elevación de los niveles sanguíneos de T_3 (tirotoxicosis por T_3). Este síndrome puede presentarse como parte de la enfermedad de Graves, pero también ha sido observado en 5% de los pacientes con bocio nodular tóxico, después de la ingestión de yodo en pacientes con deficiencia previa de yodo y en pacientes con hipertiroidismo recurrente después del tratamiento con yodo radiactivo, con agentes bloqueadores tiroideos o debido a cirugía.

Una entidad menos frecuentemente hallada es la toxicosis por T_4 , en la cual los niveles de T_3 son normales o ligeramente elevados y la T_4 está considerablemente aumentada. Esta entidad se ve frecuentemente cuando hay una alteración a nivel de la conversión de T_4 a T_3 en pacientes con cuadros debilitantes crónicos. También se observa en pacientes con hipertiroidismo después de recibir material de contraste yodado empleado en procedimientos radiológicos.

El hipertiroidismo neonatal es un estado de hiperfunción tiroidea observado en los neonatos de madres cuyos sueros muestran la presencia de inmunoglobulinas estimulantes de la tiroides (IET). Se postula que esta condición es provocada por la transferencia transplacentaria de las EIT maternas.^{[ref\(1835\)](#)} El curso de este cuadro es benigno con una remisión espontánea.

Tratamiento.

El tratamiento del hipertiroidismo está dirigido a eliminar el exceso de tejido tiroideo



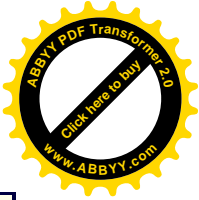
funcional (cirugía o yodo radiactivo) mediante la inhibición de la producción de hormonas con drogas bloqueadoras de la tiroides incluyendo medicamentos como el propiltiouracilo (PTU), el metamazol, y la solución saturada de yoduro de potasio (SSKI) o solución de lugol. Finalmente los síntomas de hipertiroidismo se pueden aminorar usando drogas bloqueadoras de los receptores beta-adrenérgicos. Todos estos métodos son empleados en la actualidad y la elección depende de la causa del hipertiroidismo, de la presencia de situaciones clínicas especiales y las preferencias personales del clínico. Actualmente, el tratamiento con yodo es el más frecuente.

Hipotiroidismo

Causas.

El estado clínico de hipotiroidismo se desarrolla cuando no existe una cantidad disponible suficiente de hormona tiroidea a nivel tisular. Sin lugar a dudas, el grupo más frecuente de trastornos causales de hipotiroidismo es el de las enfermedades que afectan específicamente la glándula tiroides (ver el siguiente cuadro).

Causas de hipotiroidismo
Disfunción tiroidea primaria
Lesiones parenquimatosas
Tiroiditis
Linfocítica crónica (de Hashimoto)
Subaguda
Ablación terapéutica
Después del tratamiento con ^{131}I
Después de la cirugía
Disgenias tiroideas
Aplasia
Displasia
Infiltración tiroidea
Tumores
Hormonogénesis anormal
Deficiencia de yodo (bocio endémico)
Exceso de yodo (>6 mg/día)
Fármacos que bloquean la tiroides
Defectos congénitos y adquiridos de la síntesis y
metabolismo de las tiroglobulinas
Hipotiroidismo pituitario (deficiencia de TSH)
Hipotiroidismo hipotalámico (deficiencia de TRH)
Reducción de la respuesta periférica a la hormona tiroidea



La tiroiditis de Hashimoto probablemente representa la causa de hipotiroidismo más frecuente. Se cree que esta enfermedad es el resultado de un trastorno inmunológico. Se postula la existencia de trastornos mediados por inmunidad celular y humoral.^{ref(1836)} Las características más importantes de la tiroiditis de Hashimoto consisten en la presencia de un defecto en la organificación del yodo y de una infiltración linfocítica de la glándula con una pérdida concomitante de tejido tiroideo. Estos rasgos de la enfermedad se reflejan clínicamente en la aparición de una tiroides aumentada de tamaño y en algunos casos, de síntomas, signos, y hallazgos de laboratorio de hipofunción tiroidea. La alteración del sistema inmunológico se expresa por la presencia de anticuerpos antitiroideos en el suero de estos pacientes. Los anticuerpos antimicrosomales se encuentran presentes en el 90 a 95% de los pacientes.

El hipotiroidismo a menudo aparece en la enfermedad de Graves después de tratamientos con tiroidectomía y yodo radioactivo. Las anormalidades del desarrollo de la tiroides así como los tumores y otros procesos infiltrantes capaces de desplazar y destruir el tejido tiroideo pueden causar ocasionalmente hipotiroidismo. El hipotiroidismo puede ser causado por defectos congénitos de la hormonogénesis y el efecto de algunos fármacos. Las enfermedades hipofisiarias e hipotalámicas son condiciones raras que ocasionalmente conducen a un hipotiroidismo como consecuencia de una secreción inadecuada de TRH o TSH.

Hallazgos de laboratorio.

Independientemente de la causa, los hallazgos de laboratorio en hipotiroidismo se caracterizan por una disminución de los niveles séricos de T_4 , T_3 , T_4L , IT_4L y IRT_3 . El grado de anormalidad determinado por estas pruebas varía ampliamente según sea la causa del hipotiroidismo y la etapa de la enfermedad. En la Tabla 44-4 se presentan algunos resultados característicos de las pruebas de laboratorio. Por ejemplo, el hipotiroidismo provocado por una enfermedad tiroidea intrínseca (hipotiroidismo primario) mostrará una elevación de los niveles de TSH y una respuesta exagerada a la estimulación de la TRH. El hipotiroidismo causado por una enfermedad hipofisiaria (secundario) o hipotalámica (terciario) mostrará niveles normales o subnormales de TSH y de las repuestas a la TRH, como se ha mencionado previamente.

El hipotiroidismo que aparece en el período neonatal puede conducir a un retardo severo del crecimiento y de la maduración del sistema nervioso central (cretinismo). Por consiguiente es extremadamente importante detectar esta anormalidad en una fase temprana del período neonatal.^{ref(1837)} Los anticuerpos bloqueadores de la TSH que se encuentran en el suero de pacientes con tiroiditis atrófica pueden ser transportados a través de la placenta y causar hipotiroidismo temporal en el período neonatal. Este hipotiroidismo remite a medida que los anticuerpos desaparecen.

Tratamiento.

El tratamiento del hipotiroidismo consiste en la administración oral de hormona tiroidea de reemplazo, la cual revierte los hallazgos de laboratorio y los signos y síntomas clínicos, siempre y cuando no existan anormalidades en el transporte y utilización periférica de las hormonas tiroideas. La levotiroxina (T_4), que es convertida en los tejidos a T_3 , es el agente

1800



usado más frecuentemente. La dosis promedio de reemplazo en la mayoría de los adultos es 1.6 μg / Kg de peso corporal.

Bocio

El bocio es un aumento de tamaño de la glándula tiroides. Los diversos bocios pueden acompañarse de hipertiroidismo, hipotiroidismo, o función normal. Anatómicamente, los tipos de bocios pueden ser difusos o multinodulares. El bocio difuso se caracteriza por una hipertrofia y aumento de tamaño uniforme de la glándula tiroidea. En el bocio multinodular la glándula tiroides está aumentada de tamaño en forma irregular, lo que resulta en la formación de nódulos superficiales y profundos dentro de la glándula.

Nódulo solitario

El nódulo solitario se refiere a la presencia de un aumento de tamaño localizado en una porción de la glándula tiroides. Aunque la mayoría de estos nódulos son de causa benigna como quistes, hemorragias localizadas, tiroiditis focal, y adenomas, también pueden ser causados por tumores malignos de la tiroides. Se ha asociado la terapia de irradiación externa con el desarrollo ulterior de procesos tiroideos benignos y malignos.^{ref(1838)} Dicha terapia se utilizaba antiguamente para tratar amígdalas agrandadas y otras afecciones de la cabeza, cuello, o tórax.

Cáncer tiroideo

Los tumores tiroideos malignos primarios más frecuentes provienen de las células epiteliales de los folículos. Los pacientes con cáncer tiroideo usualmente no muestran anormalidades significativas de la función tiroidea. Estos tumores a menudo liberan tiroglobulina en la circulación, la cual puede ser monitoreada como indicador del tumor. Raramente, estos pacientes tienen anticuerpos contra tiroglobulina lo cual puede invalidar las pruebas y exámenes para su detección. Dado que otras enfermedades tiroideas también pueden causar un incremento del nivel de tiroglobulina, este parámetro es más adecuado para seguir la actividad de la enfermedad luego de su diagnóstico específico.

Existe un tipo diferente de cáncer tiroideo que se origina en las células C parafoliculares de la tiroides y es denominado “carcinoma medular”. Estos tumores secretan calcitonina, una hormona que induce una disminución del calcio sérico, y que sirve como marcador tumoral útil para el diagnóstico y el seguimiento de estos pacientes.

Resistencia tisular periférica a la hormona tiroidea

Generalmente, la elevación de los niveles séricos de hormona tiroidea puede ser una consecuencia de un hipertiroidismo verdadero, de anormalidades de las proteínas fijadoras de tiroxina, o de anormalidades a nivel del metabolismo periférico de la hormona tiroidea. En ausencia de anormalidades cuantitativas de las proteínas fijadoras de tiroxina, la presencia de niveles séricos elevados de hormona tiroidea usualmente es sugestiva de un hipertiroidismo. Se han descrito casos en los que se observó una elevación anormal de T_4 y T_3 , niveles basales normales de TSH, y respuestas normales o aumentadas de la TSH a la estimulación con TRH. En estos casos existe una resistencia a la hormona tiroidea a nivel celular. La presentación



clínica en estos casos varía. Los pacientes pueden tener función tiroidea normal o deficiente.

Pruebas de Función Tiroidea

La propiedad tiroidea de concentrar el yodo es utilizada para evaluar la función tiroidea y para obtener imágenes anatómicas funcionales de la glándula. Estos estudios se basan en la administración de una cantidad mínima de yodo radiactivo. (^{123}I o ^{131}I). La radiactividad emitida en forma de rayos gamma por el yodo radiactivo concentrado en la tiroides es detectada mediante instrumentos especialmente diseñados. La información obtenida se usa para calcular las tasas de incorporación tiroidea de yodo radiactivo y para crear imágenes de la glándula. El radioisótopo preferido es el ^{123}I , dado que produce mejores imágenes y libera dosis más reducidas de radiación en la tiroides del paciente. Las muestras séricas para los radioensayos hormonales que se obtienen después de la administración de material radiactivo deben ser examinadas para detectar la presencia de radiactividad residual antes de comenzar el ensayo para evitar resultados erróneos.

Captación tiroidea de yodo

Este parámetro mide el porcentaje de una dosis de yodo radiactivo administrado que se concentra en la glándula tiroides mediante procesos de captación y organificación. Esta determinación se puede realizar a diferentes intervalos después de la administración de yodo radiactivo. Se pueden obtener imágenes y conteos de la tiroides a las 4 y 24 horas después de la dosis del radioisótopo. La dosis de ^{123}I es aproximadamente 200 μCi . Teóricamente, el grado de incorporación tiroidea en un momento dado refleja la síntesis y excreción de hormonas tiroideas y por lo tanto, el estado funcional de la tiroides. La prueba de captación de yodo está aumentada en la enfermedad de Graves. La disminución de la incorporación de yodo por la tiroides se observa no sólo en el hipotiroidismo sino también en ciertas condiciones con hiperfunción tiroidea, como: 1) tirototoxicosis facticia causada por la administración exógena de hormona tiroidea, 2) tiroiditis subaguda, 3) hipertiroidismo inducido por yodo, 4) tiroiditis linfocítica crónica, y 5) tiroides ectópica.

Prueba de estimulación con TRH

La prueba de estimulación con TRH se basa en la interdependencia entre las secreciones de la TRH y la TSH. Normalmente, después de la administración intravenosa de TRH se observa un incremento de los niveles sanguíneos de TSH, que a su vez inducen una elevación de los niveles séricos de T_4 y T_3 . [refs\(1839\)](#) Diversos factores influyen en las respuestas de la TSH a la estimulación de la TRH. Las respuestas anormales a la estimulación con TRH son de dos tipos diferentes. El primero se caracteriza por un aumento subnormal de la TSH al estímulo con TRH. En estos casos se dice que la respuesta de la TSH a la estimulación con TRH está inhibida. Esta respuesta se observa en disfunciones pituitarias. El segundo tipo de respuesta anormal se observa en el hipotiroidismo primario y consiste en un incremento de TSH sérica mayor al incremento normal subsecuente a la administración de TRH. Ejemplos

de diversas respuestas a la estimulación con TRH se muestran en la Fig. 44-7. En estados de depresión pueden verse respuestas con niveles bajos de TSH, durante el uso excesivo de glucocorticoides, y en la enfermedad de Graves.

Las principales aplicaciones clínicas de la prueba de estimulación con TRH son: 1) diagnóstico del hipertiroidismo subclínico o hipertiroidismo bioquímico temprano, 2) evaluación de pacientes con oftalmopatía sin hipertiroidismo, y 3) diagnóstico de hipotiroidismo hipotalámico e hipofisiario. Excepto en casos muy raros de hipertiroidismo inducido por hipersecreción de TSH, un aumento significativo de TSH durante la prueba de estimulación con TRH permite descartar el diagnóstico de hipertiroidismo.

Prueba de estimulación con TSH

La administración de TSH exógena estimula todas las fases de la función tiroidea, lo que se refleja en un aumento de la incorporación tiroidea de yodo y de los niveles sanguíneos de hormona tiroidea. La prueba de estimulación con TSH se lleva a cabo mediante el monitoreo de la incorporación de yodo radiactivo antes (valor basal) y después de la administración de TSH durante 3 días consecutivos. Normalmente se observa un incremento de los niveles séricos de T_4 y de la incorporación de yodo equivalentes a más de 1.5 veces los valores basales en respuesta a la administración de TSH. El principal uso de esta prueba ha sido la diferenciación entre el hipotiroidismo primario y sus formas secundarias o terciarias. En general esta prueba ha sido reemplazada por las determinaciones séricas de TSH y por la prueba de estimulación con TRH.

Prueba de la supresión con triyodotironina (T_3) o Citomel

Esta prueba consiste en una determinación de la incorporación tiroidea de yodo 24 horas antes (valor basal) y después de la administración oral de T_3 durante 7 a 10 días.[ref\(1840\)](#) Las imágenes y los valores de incorporación de yodo radiactivo son obtenidas simultáneamente. El propósito de esta prueba consiste en establecer la presencia de tejido tiroideo autónomo que no responde a los cambios de la TSH. Normalmente, la administración de hormona tiroidea (T_4 o T_3) interrumpirá la secreción de TSH en la hipófisis. La ausencia de TSH causa una disminución de la concentración tiroidea de yodo radiactivo. Una glándula tiroidea hiperactiva a menudo es autónoma, por lo tanto la supresión de la TSH mediante la administración de hormona exógena no se acompañará por la disminución correspondiente de la incorporación tiroidea de yodo radiactivo. Normalmente, después de la administración de T_3 , se observa un descenso (supresión) de 30 a 50% del valor basal de la incorporación del yodo radioactivo.

Prueba de la descarga con perclorato

Esta prueba permite detectar defectos de la organificación del yodo presentes en condiciones como la tiroiditis de Hashimoto y los bocios congénitos. También se usa para determinar el grado de importancia de los defectos de la organificación provocados por ciertos fármacos bloqueadores de la tiroides que se emplean en el tratamiento del hipertiroidismo con el objeto de valorar sus efectos terapéuticos.



Alteraciones Bioquímicas en Estados Patológicos

La función tiroidea puede ser evaluada mediante la determinación de diversos cambios en la sangre. Las Tablas 44-4 a 44-6 resumen estos cambios en diversos estados patológicos.

Yodo fijado a las proteínas (YFP)

Históricamente, el yodo fijado a proteínas, YFP, fue empleado para evaluar indirectamente la concentración de hormona tiroidea en la sangre. Esta prueba determina el yodo contenido en las hormonas tiroideas, así como el yodo de origen no hormonal que también se fija a las proteínas. Esta prueba ha sido reemplazada por otras más exactas.

T₄ sérica (Ver métodos, pág. 888)

La elevación de los niveles séricos de T₄ total puede producirse como resultado de un aumento de la síntesis hormonal, por un incremento de la liberación de hormona de las células tiroideas, o por un incremento de la capacidad de fijación de las proteínas plasmáticas, especialmente la GFT. El aumento de la secreción de hormona se observa más frecuentemente en los estados de hipertiroidismo. Las causas de hipertiroidismo se enumeran en el cuadro de la pág. 878. El incremento de la liberación de T₄ se observa en la tiroiditis subaguda, en la tiroiditis de Hashimoto, y después de irradiaciones. El incremento de los niveles séricos de GFT debido a causas diversas (ver cuadro, pág. 877) provoca elevaciones del nivel sérico de T₄ total. Estas condiciones no se acompañan de hipertiroidismo.

T₃ sérica

En general los aumentos desproporcionados de los niveles séricos de T₃ acompañan a los de T₄ en la mayoría de los estados de hipertiroidismo. Por lo tanto no es necesario medir la T₃ rutinariamente. Aproximadamente en el 5% de los casos pueden ocurrir aumentos de la T₃, mientras que los niveles de T₄ permanecen normales. Esta situación se llama toxicosis de T₃, y en estos casos la T₃ se debe usar como control del tratamiento.

Niveles de hormona tiroidea libre: evaluaciones directas o indirectas.

Las hormonas tiroideas en la sangre se encuentran distribuidas en dos compartimentos: el compartimento de hormonas fijadas a proteínas y el compartimento de hormonas libres (Fig. 44-8). Las variaciones de la hormona tiroidea total cuantificables en la sangre pueden ser el resultado de alteraciones de los niveles de proteínas fijadoras. El hipotiroidismo e hipertiroidismo aparecerán solamente si se produce una disminución o un incremento netos y persistentes de hormona tiroidea libre en la sangre. Debido a la poca utilidad que tiene la medición de hormona total sérica, en 1990 la Sociedad Americana Tiroidea recomendó que la medida de hormona libre sea evaluada ya sea directa o indirectamente.[ref\(1841\)](#) Las determinaciones de los niveles sanguíneos de T₃ y T₄ tienen mayor importancia clínica solamente si los niveles funcionales de proteína fijadora de tiroxina en la sangre se conocen previamente. Esto se logra con las pruebas de incorporación a resinas que no determinan

niveles hormonales específicos *per se*, sino que permiten conocer el estado funcional (capacidad de fijación de hormonas) de las proteínas fijadoras sanguíneas (como la GFT).

Pruebas de incorporación a resinas (IRT_3 o IRT_4)

Las pruebas de incorporación a resinas estiman la cantidad de sitios de unión libres disponibles en las proteínas plasmáticas transportadoras de hormona tiroidea, especialmente la GFT, que es la proteína transportadora más importante. La evaluación de la concentración de GFT es más comúnmente llevada a cabo mediante la prueba de incorporación a resinas. Las muestras de suero del paciente son mezcladas con hormona tiroidea marcada radiactivamente (T_3 o T_4). La cantidad de hormona tiroidea que no está fijada a la muestra es inversamente proporcional a la cantidad de sitios de fijación disponibles en el plasma (Fig. 44-8). Esta hormona no fijada se separa de la mezcla cuando se adiciona al sistema una resina con una afinidad de fijación relativamente baja (Fig. 44-8). La resina es separada del suero posteriormente y se determina la cantidad de hormona radiactiva incorporada a la resina. El grado de incorporación de hormona radiactiva a la resina es directamente proporcional al grado de saturación de los sitios fijadores de T_4 en las proteínas transportadoras de hormona (ver discusión adelante). Si hay niveles plasmáticos aumentados de GFT, aunque existan niveles normales de hormona tiroidea libre, la T_4 total se encontrará aumentada dado que el número total de sitios de fijación a nivel de las GFTs se encuentra incrementado. La T_4 o T_3 marcada encontrará una reserva aumentada de GFT libre (sitios de fijación disponibles), y permanecerá menos T_3 marcada libre para fijarse a la resina. Por lo tanto, la incorporación de la T_3 a la resina (IRT_3) se reducirá. En los estados en que existe una disminución de los niveles plasmáticos de GFT se producirán los cambios opuestos. Las condiciones que provocan anomalías de los sitios de fijación (GFT) se enumeran en la Tabla 44-4. Ciertos medicamentos (salicilato, fenitoína, furosemida, etc.) compiten con la hormona tiroidea a nivel de los sitios de fijación de la GFT. En estos casos se observa un nivel normal de T_4 libre, una disminución de la T_4 total, y una elevación de los valores de la IRT_3 .

En el hipertiroidismo, aumenta el nivel de hormona tiroidea libre en el plasma. Esto trae como consecuencia la saturación completa o casi completa de los sitios de fijación de la GFT, lo que a su vez resultará en una menor cantidad de moléculas de hormona marcada fijada a la GFT y una mayor cantidad de T_3 marcada libre. Esto causa un aumento de la IRT_3 . Recientemente, se ha tratado de cambiar la nomenclatura de prueba de incorporación a resinas con T_3 (o T_4) por la de tasa de fijación de hormona tiroidea (TIHT) para evitar confusión con las pruebas directas de T_3 (o T_4)[ref\(1842\)](#)

Índice de tiroxina libre (IT_4L)

Los efectos metabólicos y biológicos en las células efectoras son inducidos por la hormona libre. El índice de T_4 libre (IT_4L) evalúa indirectamente el nivel de T_4 libre en la sangre y corrige la mayoría de las interferencias provocadas por las anomalías de las proteínas fijadoras sanguíneas.[ref\(1843\)](#) El IT_4L es determinado a partir de la T_4 total y de los valores de incorporación a resina obtenidos con la misma muestra. El IT_4L se calcula de la siguiente manera:



$$\text{IT}_4\text{L} = \frac{\text{T}_4 \text{ sérica total} \times \% \text{ de incorporación a resina en el suero del paciente}}{100\%}$$

Como es de esperarse, la mayoría de las alteraciones de las proteínas fijadoras producen alteraciones recíprocas de la incorporación a resina y de los valores séricos de T_4 o T_3 totales, lo que resulta en un IT_4L normal, mientras que las alteraciones verdaderas de los niveles de hormona tiroidea libre generan cambios unidireccionales y concordantes del IT_4L . El IT_4L se encuentra elevado en el hipertiroidismo (Tabla 44-4) y disminuido en el hipotiroidismo (Tabla 44-5).

El índice de T_3 libre es calculado de modo similar al IT_4L pero a partir del nivel sérico de T_3 total. [ref\(1844\)](#) Este índice posee una aplicación y un alcance similar a IT_4L . El FT_3I puede ser de utilidad para excluir la toxicosis por T_3 en pacientes que toman anticonceptivos orales y que muestran incrementos aislados de T_3 séricos sin una elevación correspondiente de la T_4 . En general, el IT_3L no posee ventajas sobre el IT_4L y es empleado con menor frecuencia en la práctica clínica.

T_4 libre (T_4L) y T_3 libre (T_3L)

El nivel de T_4L sérico es una buena indicación del estado de secreción y metabolismo de la T_4 . El T_4L y el T_3L tienden a experimentar cambios paralelos a las concentraciones de T_4 y T_3 totales. La determinación de los niveles de hormonas libres es de utilidad clínica en los casos en los cuales otras determinaciones dan resultados contradictorios. Teóricamente, las disminuciones de los niveles de T_4 y T_3 libres reflejan estados verdaderos de hipertiroidismo e hipotiroidismo. Sin embargo, estos resultados dependen en gran medida de los métodos analíticos empleados para determinar la hormona “libre” y son de menor utilidad clínica que lo esperado.

Globulina fijadora de tiroxina (GFT)

Numerosas enfermedades causan alteraciones de los niveles de GFT (ver cuadro [text box], pág. 877) y de otras proteínas transportadoras de hormona tiroidea en el plasma. Las alteraciones de las concentraciones de estas proteínas afectan las concentraciones plasmáticas de T_4 y T_3 totales (Fig. 44-8). Dado que la mayor parte de la T_4 y la T_3 se encuentran fijadas a GFT, las modificaciones del nivel de esta proteína tienen una mayor importancia clínica. Las alteraciones de la GFT pueden ser de dos tipos: cuantitativas y cualitativas. Las anormalidades cuantitativas son aquellas caracterizadas por incrementos o descensos absolutos de los niveles de GFT en el plasma. Por consiguiente, la cantidad total de hormona tiroidea transportada en el plasma aumentará (incremento de GFT) o disminuirá (descenso de GFT).

Las anormalidades cualitativas de la GFT se refieren a las alteraciones de su capacidad de fijación más que a la aparición de cambios absolutos en la concentración plasmática de GFT. La afinidad de fijación de la GFT puede estar aumentada o disminuida como consecuencia de defectos intrínsecos de GFT. Diversas sustancias o drogas pueden fijarse firmemente a la GFT, desplazando a la hormona tiroidea de los sitios de fijación. El resultado



será una disminución de los valores séricos de T_4 y T_3 totales (Fig. 44-8) y un aumento de la T_4 y T_3 libres.

Hormona tiroideo estimulante (TSH) en el suero (ver métodos, pág. 886)

La aplicación principal de las determinaciones de TSH en suero consiste en el diagnóstico de hipotiroidismo. Los pacientes con hipotiroidismo no tratado, derivados de defectos intrínsecos de la glándula tiroides (hipotiroidismo primario), independientemente de la causa, muestran niveles séricos de TSH elevados. Los pacientes con hipotiroidismo causado por lesiones hipofisarias (secundario) o hipotalámicas (terciario) presentan niveles séricos de TSH normales o disminuidos. La diferenciación entre el hipotiroidismo secundario y el terciario se lleva a cabo mediante la prueba de estimulación con TRH.

La mayoría de los pacientes con hipertiroidismo muestran niveles séricos de TSH reducidos o no detectables, lo que refleja el efecto inhibitor de los niveles elevados de hormona tiroidea circulante sobre el eje hipotalámico hipofisario.

Avances recientes han aumentado la utilidad clínica de la TSH. Las pruebas inmunométricas (EIMs) para medir la TSH son más sensibles que los métodos de radioinmunoanálisis (RIA). Estas pruebas se conocen como técnicas de segunda generación (con una sensibilidad funcional de aproximadamente $0.1 \mu\text{UI/ml}$) o de tercera generación (con una sensibilidad funcional de aproximadamente $0.01 \mu\text{UI/ml}$). Debido a la alta sensibilidad de estas pruebas, los niveles bajos de TSH en pacientes con hipertiroidismo se pueden separar de aquellos encontrados en sujetos normales ³².

El diagnóstico de hipotiroidismo se puede hacer con mayor anticipación y certidumbre si se encuentra un nivel alto de TSH mediante un método de EIM. La especificidad de los métodos EIMs es también mayor comparado con el RIA porque usa anticuerpos contra la subunidad beta de la TSH, lo cual elimina reacciones cruzadas con la hormona estimulante del folículo (conocida ampliamente bajo su abreviatura inglesa FSH por "folicle stimulating hormone") y la gonadotropina coriónica humana (GCh), que contienen subunidades alfa similares a las encontradas en la TSH. La disponibilidad de las pruebas de TSH de tercera generación hace posible el uso de los niveles de TSH como un indicador preciso de la supresión de tejido tiroideo en pacientes con cáncer tiroideo y con nódulos.[ref\(1845\)](#) En estos pacientes se emplea el tratamiento supresivo con hormona tiroidea.

Inmunoglobulinas

Se ha sugerido que las anormalidades inmunológicas desempeñan un papel importante en la patología tiroidea.[ref\(1846\)](#) En muchos pacientes con enfermedad tiroidea es posible encontrar anticuerpos contra componentes de las células tiroideas. En pacientes con tiroiditis de Hashimoto puede detectarse un nivel elevado de anticuerpos contra tiroglobulinas o microsomas tiroideos. En la enfermedad de Graves puede hallarse un título elevado de inmunoglobulinas estimulantes de la tiroides.

Los anticuerpos bloqueadores de la TSH pueden cruzar la placenta en pacientes con tiroiditis atrófica y causar hipotiroidismo pasajero en el período neonatal. Las acciones de los anticuerpos contra los receptores de la TSH pueden ser diversas. Estos anticuerpos pueden dar lugar a los siguientes cambios: 1) desplazar la TSH sin activar a su receptor, 2) activar el

receptor y simular la acción de la TSH, 3) bloquear la TSH y causar atrofia glandular, o 4) estimular el crecimiento de la glándula sin aumentar la secreción de hormona. Los anticuerpos contra la tiroglobulina interfieren con las pruebas que miden tiroglobulina sérica.

Hallazgos de laboratorio en las enfermedades no-tiroideas (ENT)

La Tabla 44-6 describe los hallazgos de laboratorio observables en enfermedades no-tiroideas. Estas alteraciones en los valores normales de laboratorio pueden simular aquellas encontradas en enfermedades tiroideas o pueden modificar y confundir los hallazgos de laboratorio en pacientes con enfermedad tiroidea. En la práctica clínica los estados crónicos que alteran las pruebas de función tiroidea son más comunes que la enfermedad tiroidea propiamente dicha. Las ENT incluyen condiciones específicas como la cirrosis alcohólica, hepatitis, insuficiencia renal, y enfermedad psiquiátrica aguda.

Como grupo, los pacientes eutiroideos con ENT muestran T_4 total normal o disminuida, un IT_4L normal o disminuida, concentraciones normales o reducidas de T_3 total y T_3 libres, iT_3 normal o elevada, IRT_3 normal o elevada, o niveles séricos de TSH normales o ligeramente elevados.[ref\(1847\)](#) El IT_4L , que a menudo representa un índice certero de la función tiroidea, se encuentra usualmente normal, aunque también puede estar disminuido en pacientes con ENT.

La presencia de valores disminuidos de T_4 total y del IT_4L , así como niveles reducidos o subnormales de T_3 pueden indicar la existencia de un hipotiroidismo en pacientes con ENT. La presencia de niveles séricos elevados de iT_3 es de utilidad para descartar el hipotiroidismo en estos casos.[ref\(1848\)](#) Sin embargo, es menos costoso y más efectivo medir la TSH con EIMs cuando se investiga la posibilidad de hipotiroidismo en estos pacientes.

Las enfermedades hepáticas se caracterizan por alteraciones de la síntesis proteica, incluyendo las proteínas fijadoras de hormona tiroidea, y por anormalidades del metabolismo de T_4 . La cirrosis hepática alcohólica se acompaña de una disminución de la capacidad de fijación de hormonas tiroideas, lo que resulta en una IRT_3 elevada[ref\(1849\)](#) (Tabla 44-6). La T_4 total se encuentra usualmente normal o disminuida[ref\(1850\)](#) mientras que la T_4 libre está ligeramente elevada. También se observa una disminución de la conversión de T_4 a T_3 con reducción de los niveles séricos totales de T_3 y a veces también de la T_3 libre.

La hepatitis aguda se caracteriza por un aumento de la concentración sérica de GFT[ref\(1851\)](#) (Tabla 44-6), lo que resulta en una disminución del IRT_3 . En general, la hepatitis crónica activa también produce las mismas alteraciones sanguíneas que las observadas en la hepatitis aguda. Algunos pacientes con hepatitis crónica activa muestran una función autoinmune comprometida asociada con la glándula tiroides. En estos casos también aparecen alteraciones concomitantes provocadas por una ligera disminución de la función tiroidea. Este escenario incluye: 1) niveles de T_4 inferiores a lo esperado, 2) índice de T_4 libre disminuido, 3) disminución de la T_4 libre, 4) TSH sérica normal, e 5) incremento anormal de la TSH en respuesta a la TRH.[ref\(1852\)](#)

En pacientes con insuficiencia renal, los hallazgos más frecuentes consisten en una disminución de los valores séricos de T_3 total y T_3 libre[ref\(1853\)](#) debido a una disminución de la conversión periférica de T_4 a T_3 . La concentración sérica de proteína fijadora de tiroxina, la IRT_3 y la T_4 total usualmente están normales. Sin embargo la T_4 total y la T_4 libre pueden



estar ligeramente reducidas.[ref\(1854\)](#) La disminución de la T_4 total puede ser una consecuencia de la insuficiencia renal con un estado catabólico severo, y probablemente se debe a una disminución de la concentración sérica de proteínas fijadoras de tiroxina. La concentración sérica de TSH es normal.

Ocasionalmente, los pacientes con afecciones psiquiátricas agudas tienen un aumento selectivo de T_4 . La razón es desconocida, pero se ha postulado que existe una redistribución aguda de la T_4 fuera del hígado, el cual contiene un tercio de la reserva total de T_4 extratiroidea. Los niveles de T_4 típicamente se normalizan en 1 a 2 semanas después de la resolución del cuadro psiquiátrico agudo.[ref\(1855\)](#) La ENT y el hipertiroidismo se pueden encontrar juntos. En estas situaciones se observa un incremento desproporcionado de T_4 en el suero con valores de T_3 normales o sólo ligeramente elevados. Esto se debe a una disminución de la conversión periférica de T_4 a T_3 y a un incremento en la producción de T_4 .

Hallazgos de laboratorio después de intervenciones terapéuticas en enfermedades tiroideas

Los pacientes con hipertiroidismo e hipotiroidismo requieren un control minucioso después del tratamiento. Cuando la enfermedad de Graves es tratada exitosamente con cirugía se observa una normalización de los valores de T_4 , T_3 , IRT_3 , IT_4L y TSH. En pacientes tratados con fármacos antitiroideos como el propiltiouracilo (PTU) es posible observar una mejoría de las pruebas de función tiroidea después de 2 semanas de tratamiento. Debido al efecto bloqueador del PTU a nivel de la conversión de T_4 a T_3 , en algunos casos es posible observar una disminución desproporcionadamente más rápida de la T_3 .

Actualmente se utiliza con mayor frecuencia el tratamiento con yodo radiactivo (^{131}I). Las pruebas de laboratorio muestran una disminución de T_4 , T_3 , IRT_3 , IT_4L alrededor de 6 a 10 semanas después del tratamiento. Debe tomarse en cuenta que la radiactividad residual en el suero afecta los métodos de radioensayo durante los 90 días posteriores al tratamiento.

Los pacientes tratados por tirotoxicosis mediante cualquiera de los métodos mencionados pueden seguir tres cursos evolutivos. Idealmente, la función tiroidea se normaliza y esto se refleja en la normalización de los valores de laboratorio. Ocasionalmente, los pacientes continúan hipertiroides y la anormalidad de las pruebas de laboratorio persiste. A menudo los pacientes evolucionan hacia un hipotiroidismo, con una disminución anormal de los valores de T_4 , T_3 , IRT_3 , IT_4L . La indicación más temprana de la evolución hacia el hipotiroidismo consiste en una disminución de la T_4 seguida de una elevación de los niveles de TSH a medida que el eje hipotalámico-hipofisiario se recupera. Los valores de TSH pueden permanecer elevados en presencia de valores de T_4 normales, condición conocida como hipotiroidismo bioquímico. Los pacientes con enfermedad de Graves tratada pueden desarrollar un estado hipertiroides con valores normales o subnormales de T_4 pero con niveles elevados de T_3 .

El tratamiento del hipotiroidismo consiste en la terapia de reemplazo con hormona tiroidea. Durante el monitoreo del reemplazo con hormona tiroidea es muy importante tener en cuenta el efecto que las alteraciones de GFT producen sobre los niveles de hormona tiroidea. Por lo tanto, las pruebas de laboratorio deben incluir la evaluación directa o indirecta de los niveles de GFT, así como las determinaciones de IRT_3 , IT_4L y GFT. Se debe esperar unas 6 semanas antes de evaluar el nivel de TSH sérico en respuesta a la terapia de reemplazo



empleada en el hipotiroidismo. Con la introducción de las pruebas ultrasensibles EIM-TSH, es mucho más práctico diagnosticar hipotiroidismo por medio de la elevación del nivel sérico de TSH. Cuando se emplean preparaciones que contienen solamente T₃, como el citomel, los valores de T₃ se normalizan o se elevan levemente, pero los valores de T₄ permanecen ligeramente disminuidos. La normalización de los valores de T₄ y T₃ se acompaña de una disminución correspondiente de los niveles de TSH. Durante el seguimiento de pacientes tratados con T₄ es importante tener en cuenta la fluctuación que puede existir en los niveles de hormona en la sangre causada por la medicación oral. Pueden observarse aumentos en los niveles basales de T₄ entre 2 a 10 horas después de la ingestión de la medicación.[ref\(1856\)](#) Por lo tanto, se puede obtener una interpretación más precisa de los niveles de T₄ si estos se miden después de su máxima absorción, o sea 10 horas después de la ingestión del medicamento.

Métodos de Análisis

Hormona estimulante de la tiroides (tirotropina)

1.- Wen Chen

Principios de análisis

La tirotropina se compone de dos subunidades, alfa y beta. La subunidad α es idéntica a la subunidad α de la LH humana y solo difiere ligeramente de las subunidades α humanas de FSH y GCh. La subunidad β de tirotropina tiene una estructura primaria de aminoácidos que es significativamente diferente de las de LH (hormona luteinizante), FSH y GCh.

Anteriormente, la medición de TSH en suero se realizaba por radioinmunoanálisis (RIA) para diagnosticar hipertiroidismo primario, una condición caracterizada por un aumento en la concentración de TSH. El desarrollo de métodos de inmunoensayo más sensibles ha permitido la evaluación de la tirotoxicosis dentro de las determinaciones de la función clínica de la TSH. La tirotoxicosis es una condición asociada con concentraciones subnormales de la TSH en la circulación. Aunque todos los procedimientos de inmunoensayo pueden detectar aumentos en las concentraciones de TSH, solamente los métodos más recientes son capaces de detectar las concentraciones suprimidas de TSH en suero que pueden alcanzar valores menores a 0.1 mIU/L. [ref\(1857\)](#)

El procedimiento del RIA para la TSH se le denomina comúnmente procedimiento de segunda generación. El desarrollo de métodos de inmunoensayos más sensibles y con límites de detección más bajos ha conducido al uso de términos como “sensible”, “supersensible” y “ultrasensible” para describir las características del desempeño de cada ensayo particular. Estas designaciones se han reemplazado por el uso de la terminología como segunda, tercera, y cuarta generación para describir los límites de detección de 0.1, 0.01 y 0.001 mIU/L respectivamente. [ref\(1858\)](#) Estos límites están definidos por su “sensibilidad funcional”, esto es por su capacidad para alcanzar una precisión de amplio rango con un CV de $\leq 20\%$ a estas concentraciones de TSH. Todos los ensayos de segunda y tercera generación pueden discriminar fácilmente entre el rango de los individuos eutiroideos e hipotiroideos no tratados así como la mayoría de los hipertiroides.

La mayoría de los primeros inmunoensayos de TSH que había comercialmente eran

capaces de distinguir niveles normales de TSH de los valores hipertiroides pero no podían diferenciar de manera confiable entre los valores ligeramente subnormales (0.01 a 0.1 mIU/L) y los valores excesivamente bajos (<0.01 mIU/L) característicos de la toxicosis.[ref\(1859\)](#)

El procedimiento de RIA para la TSH (Tabla 44-7, método 1) se basa en la unión competitiva entre una cantidad fija de TSH marcada radiactivamente y TSH del suero del paciente por un número limitado y fijo de sitios de unión al anticuerpo de TSH. La cantidad de TSH marcada radiactivamente que se une al anticuerpo está inversamente relacionada con los niveles de TSH presentes en la muestra del paciente.

Se ha desarrollado un ensayo inmunoradiométrico de dos sitios (Tabla 44-7, método 2).[ref\(1860\)](#) Este reciente ensayo de “sandwich” utiliza dos o más anticuerpos dirigidos contra diferentes porciones de las moléculas de TSH, dando lugar a que la TSH quede situada entre los anticuerpos. El segundo anticuerpo anti-TSH puede utilizar también varias marcas incluidas los radioisótopos, enzimas, fluoróforos o moléculas quimioluminiscentes (ver adelante). En este procedimiento, primero la TSH reacciona con un exceso de anticuerpo marcado radiactivamente dirigido contra un sitio único en la molécula de la TSH, por lo que toda la TSH presente en los pacientes se une a través del anticuerpo. En la segunda fase del ensayo, los complejos anticuerpo marcado-TSH reaccionan con un segundo anticuerpo fijado a un soporte de fase sólida. Este segundo anticuerpo está dirigido contra un sitio de la molécula de TSH diferente al del primer anticuerpo. El complejo anticuerpo marcado radiactivamente /TSH/anticuerpo en la fase sólida, se separa después de la mezcla de reacción, se lava para eliminar cualquier residuo de anticuerpo marcado aún presente, y se cuenta la marca unida. La cantidad de marca está directamente relacionada con la concentración de TSH presente en el suero del paciente.

El uso de marcas enzimáticas para las mediciones inmunométricas de TSH ha reemplazado al RIA en general. Característicamente, los inmunoensayos enzimáticos utilizan peroxidasa de rábano o fosfatasa alcalina como las marcas enzimáticas. Se han introducido ensayos de TSH más sensibles, basados en la quimioluminiscencia y la fluorescencia resuelta por tiempo.[refs\(1861\)](#) Las marcas quimioluminiscentes incluyen los ésteres de acridinio, luminol (3-aminofthalhidrazida) y fosfatos de dioxitano, mientras que los ensayos inmunofluorométricos emplean marcas de europio.

Se han desarrollado varios sistemas de separación para usarse con estos métodos recientes de inmunoensayo. La separación se puede realizar mediante la inmovilización del anticuerpo de captura en una fase sólida como esferas de plástico, papel de fibra de vidrio, o tubos de ensayo, de manera que el compuesto analizado libre y el unido se separan por decantación o lavado. Otros sistemas utilizan partículas ferromagnéticas fijadas al anticuerpo para llevar a cabo la separación con imanes. Otra variación es fijar la biotina, un aglutinante de avidina de alta afinidad, al anticuerpo. La separación de los complejos sandwich de TSH se obtiene mediante el uso de la avidina que se fija a una fase sólida.[ref\(1862\)](#)

El método inmunoquimioluminométrico AICM (Tabla 44-7, método 3) utiliza un anticuerpo monoclonal de ratón contra la TSH total que está colocada sobre una fase sólida. El anticuerpo revelador, anticuerpo policlonal de cabra contra TSH, está conjugado con fosfatasa alcalina (FAL). Después de un período de incubación, cualquier conjugado presente se remueve y luego se adiciona un sustrato quimioluminiscente. En la presencia de FAL este sustrato sufre una reacción de hidrólisis para formar un compuesto intermediario inestable, acompañado de la producción de luz. La generación de luz se detecta mediante un



luminómetro y es proporcional a la concentración de TSH en la muestra.

La determinación de TSH basada en un ensayo inmunofluorométrico resuelto por tiempo, EIFM-RT (Tabla 44-7, método 4) emplea una fase sólida de dos sitios que implica tres anticuerpos monoclonales dirigidos contra la TSH.[ref\(1863\)](#) El anticuerpo de captura se distribuye sobre la superficie de un pozo de microensayo y los otros dos anticuerpos, marcados con europio, se dirigen contra diferentes sitios antigénicos en la subunidad α de la TSH. Después de un período de incubación y del paso de lavado para remover cualquier anticuerpo marcado, se adiciona una solución reveladora para disociar los iones de europio de los anticuerpos marcados en la solución. Los iones de europio disociados forman quelatos fluorescentes con los componentes de la solución reveladora. La intensidad de la fluorescencia se mide con un fluorómetro de resolución por tiempo.

La presencia de anticuerpos heterofílicos en el suero del paciente se considera como una fuente importante de interferencia en algunos procedimientos de inmunoensayo para TSH. Estas inmunoglobulinas antiespecies actúan como la TSH para “entrecruzar” el anticuerpo monoclonal de captura que está marcado. Se atribuye la presencia de estos anticuerpos a 1): la exposición a proteínas animales en individuos tratados con vacunas preparadas en cultivos de tejido por personas que manejan a los animales, y 2) a individuos expuestos a anticuerpos antitumorales monoclonales de ratón usados para técnicas de generación de imágenes o en terapia. Los sueros de ratón se pueden adicionar al reactivo o a la muestra del paciente para eliminar este problema en los ensayos que usan anticuerpos monoclonales de ratón.[ref\(1864\)](#) Sin embargo, se debe señalar que puede ocurrir alguna interferencia en los ensayos de TSH debido a otros efectos no específicos del ensayo de la fase sólida, los cuales no se corrigen por la adición del suero de ratón.

Especimen

Los especímenes de suero o plasma son aceptable, aunque algunos métodos de TSH recomiendan solamente el uso de suero. Existe un ritmo circadiano pequeño pero significativo en la secreción de TSH. Los valores máximos ocurren al final de la tarde y alrededor de la medianoche.[ref\(1865\)](#) Sin embargo, esto no afecta la utilidad clínica de la medición y es posible obtener información clínica útil de muestras tomadas a cualquier tiempo deseado. La TSH se mantiene estable en suero hasta por 5 días a 4 °C. Sin embargo, las muestras pospuestas por más de 24 horas para analizarse tienen que congelarse a -20 °C para obtener mejores resultados. Las muestras congeladas previamente deben mezclarse minuciosamente antes de su análisis para asegurar su homogeneidad. No deben usarse especímenes hemolisados o lipémicos.

Intervalo de referencia

El intervalo de referencia para TSH depende del ensayo usado y de la población de referencia que ha sido analizada. El intervalo de referencia aproximado es de 0.5 a 5.75 miliunidades internacionales/L.[ref\(1866\)](#) Las concentraciones de TSH son similares para ambos sexos hasta alrededor de 60 años de edad. Las mujeres mayores de 60 años muestran una concentración promedio de TSH más alta comparada con mujeres más jóvenes.[ref\(1867\)](#) Los recién nacidos muestran concentraciones de TSH aumentadas que disminuyen hasta alcanzar los niveles adultos dentro de la primera semana de vida.



Tiroxina

I.-Wen Chen

Principios de análisis

Los métodos modernos para medir los niveles séricos de hormonas tiroideas comenzaron con el desarrollo de los ensayos de unión competitiva para medir T_4 total, descritos inicialmente por Ekins en 1960.[ref\(1868\)](#) Este procedimiento utiliza las características de unión específicas de la globulina fijadora de tiroxina (GFT) a T_4 . La GFT purificada se adhería a un soporte sólido y se incubaba con la muestra del paciente y una cantidad fija de T_4 marcada radiactivamente. La T_4 del paciente y la T_4 radiomarcada competían por un número limitado de sitios de la GFT. Un paso de lavado removía la T_4 que permanecía no unida y después, se contaba la radiactividad que quedaba en la columna.

El ensayo de unión de GFT para T_4 planteaba varios problemas analíticos inherentes. La presencia de proteínas fijadoras endógenas en el suero del paciente puede interferir con la unión de T_4 a la GFT. Además, dado que más del 99.9% de T_4 en suero está unida a GFT o a otras proteínas fijadoras de tiroxina, era necesario extraer T_4 de la GFT endógena y después remover la GFT endógena para que no interfiriese con la fijación de T_4 por la GFT adherida a la fase sólida. La extracción de T_4 de GFT se puede lograr mediante la incubación del suero con etanol o usando ácido 8-anilino-1-naftalensulfónico (ANS). La dilución de la muestra con amortiguador de barbituratos previene la unión de T_4 a otras proteínas fijadoras de T_4 como la prealbúmina o la albúmina.

El desarrollo y aplicación de técnicas para producir anticuerpos dirigidos contra T_4 condujo al uso del radioinmunoanálisis (RIA) (Tabla 44-8, método 1) para la medición de T_4 . Los principios básicos del RIA y de los ensayos competitivos de tiroxina por unión a proteína son los mismos, excepto que en el RIA la proteína fijadora es un anticuerpo. Las diferencias entre los diversos procedimientos de RIA disponibles comercialmente residen en las técnicas usadas para separar los ligandos radiomarcados libres de los que están fijados al anticuerpo. Las técnicas más comúnmente usadas emplean un procedimiento de separación de fase sólida. El anticuerpo de T_4 se encuentra unido química o físicamente a un soporte de fase sólida como esferas plásticas, tubo de plástico o partículas magnéticas. La T_4 marcada y la no marcada compiten por fijarse a este anticuerpo adherido, la T_4 no fijada se separa del complejo anticuerpo- T_4 fijado mediante un paso de lavado. La separación del complejo anticuerpo- T_4 se logra con el uso de un segundo anticuerpo o de polietilenglicol.

El uso de métodos de inmunoensayo que emplean marcas que no son radioisótopos se ha vuelto cada vez más común. Varios de los ensayos originales no radioisotópicos eran, como el RIA, ensayos heterogéneos que requerían un paso de separación para remover cualquier ligando no fijado de la mezcla de reacción (ver adelante). Para evitar los pasos de separación de los ensayos heterogéneos, se han desarrollado métodos de inmunoensayo que no requieren separar la marca fijada de la no fijada. Estos ensayos homogéneos (no necesitan un paso de separación) utilizan una marca que tiene algunas características fisicoquímicas alteradas cuando la T_4 marcada está fijada al anticuerpo.

Uno de los primeros inmunoensayos homogéneos que se desarrollaron fue la técnica de inmunoensayo amplificado por enzima (TIAE, Syva Inc., Palo Alto, Calif.). En este



sistema (Tabla 44-8, método 2), la T_4 está marcada con la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6-PD). Cuando la T_4 fijada a la enzima se une al anticuerpo anti- T_4 el sitio de la enzima es bloqueado, causando una reducción en la actividad de G-6-PD. La presencia de T_4 del paciente previene la fijación de la T_4 marcada, conduciendo a un aumento en la actividad enzimática. La concentración sérica de T_4 es directamente proporcional a la actividad enzimática en este ensayo TIAE.

Otra técnica de inmunoensayo homogéneo ampliamente utilizada es el inmunoensayo de polarización de fluorescencia (IEPF) (Tabla 44-8, método 3). En este ensayo, la T_4 del espécimen compite con la T_4 marcada con fluoresceína por un número limitado de sitios de unión al anticuerpo. La absorción de la luz polarizada por la T_4 marcada con fluoresceína da lugar a la reemisión de luz fluorescente polarizada únicamente si la T_4 marcada con fluoresceína está fijada al anticuerpo. La T_4 fluoresceinada no fijada, que posee alta movilidad, emite luz polarizada (ver capítulos 4 y 13).

Otro método de inmunoensayo homogéneo para medir la T_4 es el inmunoensayo del donador enzimático clonado (IDEC) (Tabla 44-8, método 4). Este procedimiento utiliza la enzima β -galactosidasa, que ha sido clonada como dos fragmentos inactivos. Uno de los fragmentos se usa como la marca para T_4 . La adición del anticuerpo anti- T_4 da lugar a la unión de los complejos T_4 -fragmento enzimático al anticuerpo, previniendo de esta manera la asociación de los fragmentos inactivos de la enzima y la formación de la enzima activa. Sin embargo, la presencia de la T_4 del paciente resulta en la formación parcial de los complejos del fragmento enzimático- T_4 que están siendo desplazados del anticuerpo, permitiendo la asociación de los fragmentos enzimáticos para producir la enzima activa. Los niveles séricos de T_4 están directamente relacionados con la actividad enzimática en el IDEC.

El desarrollo de la instrumentación para realizar el paso de separación requerido en los ensayos heterogéneos ha dado lugar a una variedad de sistemas analíticos que pueden llevar a cabo ensayos heterogéneos automatizados. Un ejemplo de estos sistemas es la técnica fluorométrica de inmunoensayo enzimático (Baxter Stratus; Dade Division. Miami. Florida) (Tabla 44-8, método 5). El espécimen se aplica a la porción central de una membrana de fibra de vidrio que contiene el anticuerpo de T_4 inmovilizado. La tiroxina de la muestra se fija al anticuerpo de T_4 . Enseguida, se adiciona la T_4 marcada con la enzima para que ésta se fije a los sitios disponibles de unión al anticuerpo. La T_4 no fijada que está marcada con la enzima se remueve mediante la aplicación de una solución de lavado en el centro de la zona de reacción a fin de eluir esta fracción no fijada. Luego, se mide la actividad enzimática de la fracción fijada usando un sustrato fluorescente adecuado.

Algunas técnicas de ensayos heterogéneos automatizados emplean la centrifugación para lavar y remover cualquier reactivo no fijado y para lavar la solución de esferas plásticas recubiertas de anticuerpo (Diagnostic Products Corp., Los Angeles, Calif.) o partículas magnéticas, que pueden separarse con imanes (Tosoh, San Francisco, Calif.). Ciba Corning utiliza partículas magnéticas y marcas bioluminiscentes.

Especimen

El espécimen de elección para el análisis de T_4 es el suero. El plasma también es aceptable, aunque se debe tener cuidado para evitar la fibrina de las muestras que han sido congeladas previamente. La tiroxina es estable en el suero hasta por 14 días aun si se



almacena a temperatura ambiente. Sin embargo, se recomienda congelar las muestras si no se van a analizar dentro de las 24 horas subsecuentes a la colecta.

Intervalos de referencia

Las concentraciones de tiroxina varían significativamente entre los individuos eutroideos debido al alto grado de fijación proteica de T_4 y a la gran variabilidad de concentraciones de proteína séricas. Los intervalos de referencia para T_4 total son aproximadamente de 40 a 120 mg/L (51 a 154 nmoles/L). Las mujeres premenopáusicas tienen concentraciones de T_4 aproximadamente de 5 a 10 mg/L (6 a 13 nmoles/L) mayores que las de los hombres y las mujeres postmenopáusicas como resultado del efecto de estrógenos en el aumento de las concentraciones de GFT.

Referencias

1. Wolff J: Transport of iodide and other anions in the thyroid gland, *Physiol Rev* 44:45-79, 1964.
2. DeGroot LJ, Niepomniszcze H: Biosynthesis of thyroid hormone: basic and clinical aspects, *Metabolism* 26:665-718, 1977.
3. Dumont JE: The action of thyrotropin on thyroid metabolism, *Vitam Horm* 29:287-412, 1971.
4. Chopra IJ, Solomon DH, Chopra U, et al: Pathways of metabolism of thyroid hormones, *Recent Prog Horm Res* 34:521-567, 1978.
5. Woeber KA, Ingbar SH: The interactions of the thyroid hormones with binding protein. In Greer MA, Solomon DH, editors: *Thyroid, American handbook of physiology*, vol 3, Washington, D.C., 1973, American Physiological Society.
6. Chopra IJ: An assessment of daily production and significance of thyroidal 3,3',5'-triiodothyronine (reverse T_3) in man, *J Clin Invest* 58:32-40, 1976.
7. Schimmel M, Utiger RD: Thyroidal and peripheral production of thyroid hormones, *Ann Intern Med* 87:760-768, 1977.
8. Oppenheimer JH, Samuels HH, editors: *Molecular basis of thyroid hormone action*, New York, 1983, Academic Press.
9. Edelman IS, Ismail-Beigi F: Thyroid thermogenesis and active sodium transport, *Recent Prog Horm Res* 30:235-257, 1974.
10. Erfurth EM, Nordén NE, Hedner P, et al: Normal reference interval for thyrotropin response to thyroliberin: dependence on age, sex, free thyroxine index and basal concentrations of thyrotropin, *Clin Chem* 30:196-199, 1984.
11. Wolff J: Iodide goiter and pharmacologic effects of excess iodide, *Am J Med* 47:101-124, 1969.
12. Mason JW: Amiodarone, *N Engl J Med* 316:455-466, 1987.
13. Abuid J, Stinson DA, Larsen PR: Serum triiodothyronine and thyroxine in the neonate and the acute increases in these hormones following delivery, *J Clin Invest* 52:1195-1199, 1973.
14. Selenkow HA, Birnbaum MD, Hollander CS: Thyroid function and dysfunction during pregnancy, *Clin Obstet Gynecol* 16:66-68, 1973.
15. Portnay GI, O'Brian JT, Bush J, et al: The effect of starvation on the concentration and binding of thyroxine and triiodothyronine in serum and on the response to TRH, *J Clin Endocrinol Metab* 39:191-194, 1974.
16. McKenzie JM, Zakarija M, Sato A: Humoral immunity in Graves' disease, *Clin Endocrinol Metab* 7:31-45, 1978.
17. Christiansen NJB, Sierboek-Nielson K, Hansen JEM, Christiansen LK: Serum thyroxine in the early phase



- of subacute thyroiditis, *Acta Endocrinol* 64:359-363, 1970.
18. Dorfman SG, Cooperman MT, Nelson RL, et al: Painless thyroiditis and transient hyperthyroidism without goiter, *Ann Intern Med* 86:24-28, 1977.
 19. Roti E, Emerson CH: Clinical review 29: postpartum thyroiditis, *J Clin Endocrinol Metab* 74:3-5, 1992.
 20. Gerstein HC: How common is postpartum thyroiditis? *Arch Intern Med* 150:1397-1400, 1990.
 21. LiVolsi VA: Postpartum thyroiditis: the pathology slowly unravels [editorial], *Am J Clin Pathol* 100:193-195, 1993.
 22. McKenzie JM, Zakarija M: Pathogenesis of neonatal Graves' disease, *J Endocrinol Invest* 2:183-189, 1978.
 23. Brown J, Solomon DH, Beall GN, et al: Autoimmune thyroid disease\MGraves' and Hashimoto's, *Ann Intern Med* 88:379-391, 1978.
 24. Dussault JH, Coulombe P, Laberge C, et al: Preliminary report on a mass screening program for neonatal hypothyroidism, *J Pediatr* 86:670-674, 1975.
 25. Maxon HR III, Saenger EL, Thomas SR, et al: Clinically important radiation-associated thyroid disease: a controlled study, *JAMA* 44:1802-1805, 1980.
 26. Snyder PJ, Utiger RD: Response to thyrotropin-releasing hormone (TRH) in normal man, *J Clin Endocrinol Metab* 34:380-385, 1972.
 27. Werner SC, Spooner M: A new and simple test for hyperthyroidism employing l-triiodothyronine and the 24 hour ¹³¹I uptake method, *Bull NY Acad Med* 31:139-145, 1955.
 28. Surks MI, Chopra IJ, Mariash CN: American Thyroid Association guidelines for the use of laboratory tests in thyroid disorders, *JAMA* 263:1529-1532, 1990.
 29. Larsen PR, Alexander NM, Chopra IJ, et al: Committee on Nomenclature, American Thyroid Association: Revised nomenclature for tests of thyroid hormones and thyroid-related proteins in serum [letter to the editor], *J Clin Endocrinol Metab* 64:1089-1094, 1986.
 30. Stein RB, Price L: Evaluation of adjusted total thyroxine (free thyroxine index) as a measure of thyroid function, *J Clin Endocrinol Metab* 34:225-228, 1972.
 31. Sawin CT, Chopra D, and Albano J: The free triiodothyronine (T₃) index, *Ann Intern Med* 88:474-477, 1978.
 32. Toft AD: Use of sensitive immunoradiometric assay for thyrotropin in clinical practice, *Mayo Clin Proc* 63:1035-1042, 1988.
 33. Schlumberger M, De Vathaire F, Wu-Ahouju G, et al: Post-operative surveillance of differentiated thyroid carcinoma: contributions of the ultra-sensitive TSH assay, *Presse Méd* 16:1791-1793, Surks MI, Chopra IJ, Mariash CN: American Thyroid Association guidelines for the use of laboratory tests in thyroid disorders, *JAMA* 263:1529-1532, 1990.
 29. Larsen PR, Alexander NM, Chopra IJ, et al: Committee on Nomenclature, American Thyroid Association: Revised nomenclature for tests of thyroid hormones and thyroid-related proteins in serum [letter to the editor], *J Clin Endocrinol Metab* 64:1089-1094, 1986.
 30. Stein RB, Price L: Evaluation of adjusted total thyroxine (free thyroxine index) as a measure of thyroid function, *J Clin Endocrinol Metab* 34:225-228, 1972.
 31. Sawin CT, Chopra D, and Albano J: The free triiodothyronine (T₃) index, *Ann Intern Med* 88:474-477, 1978.
 32. Toft AD: Use of sensitive immunoradiometric assay for thyrotropin in clinical practice, *Mayo Clin Proc* 63:1035-1042, 1988.
 33. Schlumberger M, De Vathaire F, Wu-Ahouju G, et al: Post-operative surveillance of differentiated thyroid carcinoma: contributions of the ultra-sensitive TSH assay, *Presse Méd* 16:1791-1793, 1987.
 34. Chopra IJ, Solomon DH, Hepner GW, et al: Misleadingly low free thyroxine index and usefulness of reverse triiodothyronine measurement in nonthyroidal illnesses, *Ann Intern Med* 90:905-912, 1979.
 35. Chopra IJ, Solomon DH, Chopra U, et al: Alterations in circulating thyroid hormones and thyrotropin in hepatic cirrhosis: evidence for euthyroidism despite subnormal serum triiodothyronine, *J Clin Endocrinol Metab* 39:501-511, 1974.



36. Grenn JRB: Thyroid function and thyroid regulation in euthyroid men with chronic liver disease: evidence of multiple abnormalities, *Clin Endocrinol* 7:453-461, 1977. 1987.
37. Inada M, Sterling K: Thyroxine turnover and transport in Laënnec's cirrhosis of the liver, *J Clin Invest* 46:1275-1282, 1967.
38. Tabei A, Shimoda S: Increased TBG-T₄ binding capacity in acute hepatitis, *Folia Endocrinol* 49:1025-1033, 1973.
39. Schussler GC, Schaffner F, Korn F: Increased serum thyroid hormone binding and decreased free hormone in chronic active liver disease, *N Engl J Med* 299:510-515, 1978.
40. Spector DA, Davis PJ, Helderman JH, et al: Thyroid function and metabolic state in chronic renal failure, *Ann Intern Med* 85:724-730, 1976.
41. Lim VS, Fang VS, Katz A, et al: Thyroid dysfunction in chronic renal failure, *J Clin Invest* 60:522-523, 1977.
42. Cavalieri RR: The effects of nonthyroid disease and drugs on thyroid function tests, *Med Clin North Am* 75:27-39, 1991.
43. Maxon H, Volle C, Hertzberg V, et al: Variation in serum thyroxine concentrations with time after oral replacement dose, *Clin Nucl Med* 12:369-370, 1987.
44. Hay ID, Bayer MF, Kaplan MM, et al: American Thyroid Association assessment of current free thyroid hormone and thyrotropin measurements and guidelines for future clinical assays, *Clin Chem* 37:2002-2008, 1991.
45. Spencer CA, Presti JSL, Patel A, et al: Applications of a new chemiluminometric thyrotropin assay to subnormal measurement, *J Clin Endocrinol Metab* 70:453-460, 1990.
46. Miles LEM, Hales CN: Labeled antibodies and immunological assay systems, *Nature* 219:186-189, 1968.
47. Taimela E, Aalto M, Koshinen P, Irjala K: Clinical and laboratory studies of time-resolved fluorescence immunoassays of thyrotropin and free triiodothyronine, *Clin Chem* 39:679-682, 1993.
48. Taimela E, Tähtelä R, Koskinen P, et al: Ability of two new thyrotropin (TSH) assays to separate hyperthyroid patients from euthyroid patients with low TSH, *Clin Chem* 40:101-105, 1994.
49. Marstein S: Caution against spuriously increased thyrotropin values as determined by two-site immunoradiometric assays, *Clin Chem* 33:1290-1291, 1987.
50. Chen I-W, Heminger LA, Barnes EL, et al: A sensitive radioimmunoassay (RIA) for detection of serum thyrotropin (TSH) in healthy subjects and patients with suppressed pituitary function, *J Nucl Med* 24:114, 1983.
51. Lipson A, Nickoloff EL, Hsu TH, et al: A study of age-dependent changes in thyroid function tests in adults, *J Nucl Med* 20:1124-1130, 1979.
52. Ekins R: The estimation of thyroxine in human plasma by an electrophoretic technique, *Clin Chim Acta* 5:453-459, 1960.
53. Libson A, Nickoloff EL, Hsu TH, et al: A study of age-dependent changes in thyroid function tests in adults, *J Nucl Med* 20:1124-1130, 1979.

Tablas

Tabla 44-1. Relaciones fisiológicas entre la globulina fijadora de tiroxina (GFT) y las concentraciones séricas de hormona tiroidea

Reguladores biológicos finales	Alteraciones bioquímicas iniciales	Respuesta biológica intermedia	Condiciones de equilibrio
-----------------------------------	---------------------------------------	-----------------------------------	------------------------------

Incremento de GFT	Aumento de los niveles de	Disminución del mecanismo	Aumento de
GFTs			
Embarazo	GFT, saturación disminuida	de retroinhibición	Elevación de
los niveles			
Anticonceptivos orales	Aumento de la fijación de	Aumento de los niveles	séricos de T4
y T3	hormonas (T3 y T4)	séricos de TSH	Saturación
normal de	disminución de T4 y T3	Aumento de la producción	GFTs
libres normales	libres	de T4 y T3	T4 y T3
Disminución de GFT	Disminución de GFT,	Aumento del mecanismo	Disminución
de GFTs			
Andrógenos	saturación aumentada	de retroalimentación	Disminución
de T4 y T3			
Malnutrición	Disminución de la	negativa.	Saturación
normal de			
Enfermedad hepática	Fijación de hormona (T4,	Disminución de	GFTs
normales	T3).	la producción de T4 y T3	T4 y T3 libres
	Aumento de T4 y T3libres	Disminución de TSH sérica	

Tabla 44-2. Efectos de diversos medicamentos sobre la función tiroidea

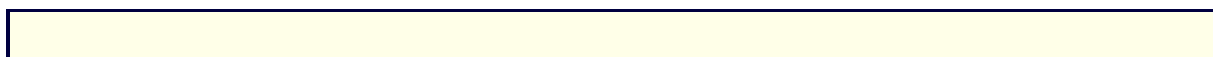
Mecanismo de acción	Medicamento	Efectos
Estimulación hipotalámica	Anfetamina	Aumento de T4, T3 y T4 libre
Inhibición de la secreción de TSH	Dopamina	Disminución de TSH
	Levodopa	Respuesta inhibida de TSH a TRH
	Glucorticoides	
	Bromocriptina	
Secreción aumentada de TSH	Metoclopramida	Respuesta aumentada de TSH a TRH
Bloqueo de la captación de yodo	Perclorato	Bloqueo de la producción de T4 y T3
	Tiocianatos	
	Nitroprusiato	
Inhibición de la organificación	Propiltiouracilo	Reducción de la producción de T4 y T3
	Metimazol	
	Sulfonilureas	
	6-mercaptopurina	
Inhibición de la liberación de T4 y T3	Litio	Disminución transitoria leve de T4, T3
		Inducción de bocio
Conversión reducida de T4 y T3		
Reducción de 5'-deyodasa tipo I	Propiltiouracilo	Disminución de T3
	Propanolol	
	Exceso de glucorticoide	
Disminución de 5'-desyodinasas tipo I y II	Amiodarona	Disminución de T3
	Telepaque (ácido iopanoico)	
	Oragrafin (sal de calcio y	



Degradación aumentada	sodio del ácido ipódico) Fenobarbital	Disminución leve de T4 y T3 y aumento de TSH
Modulación del exceso de receptores β -adrenérgicos	bloqueadores β -adrenérgicos	Efectos adrenérgicos inhibidos de T3 y T4
Disminución de la fijación de la proteína hormonal a GFT	Salicilatos Fenitoína Fenclofenac Furosemida	Disminución de T3 y T4 Aumento de IRT3

Tabla 44-3. Efectos fisiológicos básicos de la hormona tiroidea y sus relaciones con síndromes de disfunción tiroidea

	Efectos de la	Síntomas usuales	
Sistema	hormona tiroidea	Hipertiroidismo	
Hipotiroidismo			
Metabólico al frío seca generalizada peso habla lenta	Aumento de la termogénesis	Intolerancia al calor	Intolerancia
	y del consumo deO2	Rubor cutáneo	Piel pálida y
	Aumento en la disipación de calor	Aumento de la transpiración	Piel áspera
	Aumento en el catabolismo proteico	Aumento del apetito e	Letargia
	Aumento de la absorción y producción	ingestión de alimentos	Debilidad
	de glucosa (gluconeogénesis)	Pérdida de la masa muscular	Aumento de
	Aumento del consumo de glucosa	y debilidad proximal	Voz ronca y
		Pérdida de peso Onicólisis (enfermedad de la uña) Caída parpebral Exotalmo	Mixedema
Cardiovascular de la frecuencia	Aumento de la actividad	Palpitaciones	Disminución
			cardíaca
	y sensibilidad adrenérgica	Aumento de la frecuencia	(bradicardia)
sanguínea baja	Aumento de la frecuencia cardíaca	cardíaca (taquicardia)	Presión
cardíaca	Aumento de la contractilidad	Pulsos arteriales	Insuficiencia
	miocárdica (inotropismo)	hiperdinámicos	
Agrandamiento del corazón			
	Aumento del gasto cardíaco	Disnea	



	Aumento del volumen sanguíneo Disminución de la resistencia vascular periférica	Fibrilación auricular Aumento de las diferencias de la presión sanguínea (↑PA sistólica, ↓PA diastólica)	
Sistema Nervioso Central mental disminuidos mental	Aumento de la actividad y sensibilidad adrenérgica	Agitación, hipermotilidad Nerviosismo Labilidad emocional Fatiga Reflejos exagerados Temblor	Apatía Pereza Reflejos Retraso
Gastrointestinal (GI) PA, Presión Arterial.	Aumento de la motilidad	Hiperdefecación	Constipación

Tabla 44-4 Hipertiroidismo: Hallazgos de laboratorio en diversas afecciones clínicas

Entidad clínica	T ₄	T ₃	T ₄ L	IRT ₃	IT ₄ L	TSH	Estimulación de TRH	TSI
Incorporación								
tiroidea de ¹²³I								
Enfermedad de Graves	↑	↑	↑	↑	↑	↓, U	Inhibida	↑
Enfermedades de Graves eutiroidea	N	N	N	N	N	N	Inhibida, N	+ N
Bocio tóxico multinodular	↑	↑	↑	↑	↑	↓, U	Inhibida	- -, N
Adenoma tóxico	↑	↑	↑	↑	↑	↓, U	Inhibida	- -, N
T3 toxicosis	N	↑	N	N, ↑	N	↓, U	Inhibida	+, - N, ↑
Hipertiroidismo en el embarazo	↑	↑	↑	N, ↓	↑	↓, U	Inhibida	+, - *
Hipertiroidismo neonatal	↑	↑	↑	↑	↑	↓, N	Inhibida	+ *
Tiroiditis subaguda	↑, N	↑, N	↑, N	↑, N	↑, N	N, ↓, U	Inhibida, N	- ↓, N
Hipertiroidismo exógeno con T4	↑	↑	↑	↑	↑	↓, U	Inhibida	- ↓
Tumores trofoblásticos N, ↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑, N, ↓	Inhibida	- ↓,
Tumores hipofisarios con secreción TSH	↑	↑	↑	↑	↑	↑	N, ↑	- ↑
Pseudohipertiroidismo	↑	↑, N	↑, N	↑, N	↑, N	↑, N	N	- N o

↑, Elevado; ↓, reducido; +, presente; -, ausente; *, prueba contraindicada o no recomendada.

Tabla 44-5 Hallazgos de laboratorio en el hipotiroidismo

Tipo	T4	T3	IRT3	IT4L	TSH	Estimulación de TRH *	Ab
Primario	↓	↓, N	↓, N	↓	↑	↑	⊥
Secundario	↓	↓	↓	↓	↓, N	↑	—
Terciario	↓	↓	↓	↑	↓, N	N	—
Falta de respuesta periférica	↑	↑	N	↑ o N	↑ o N		N o ↑

* Evaluado a través de la respuesta de la TSH sérica a la administración de TRH.

⊥ 10% de población normal tiene anticuerpo de antiperoxidasa aguda, más común en mujeres que en hombres.

Ab, Anticuerpos contra la peroxidasa microsómica de la tiroides; N, Normal; ↑, elevado; ↓, reducido. Vea Tabla 44-4 para abreviaturas.

Tabla 44-5.

Tabla 44-6.

Tabla 44-7.

Figuras

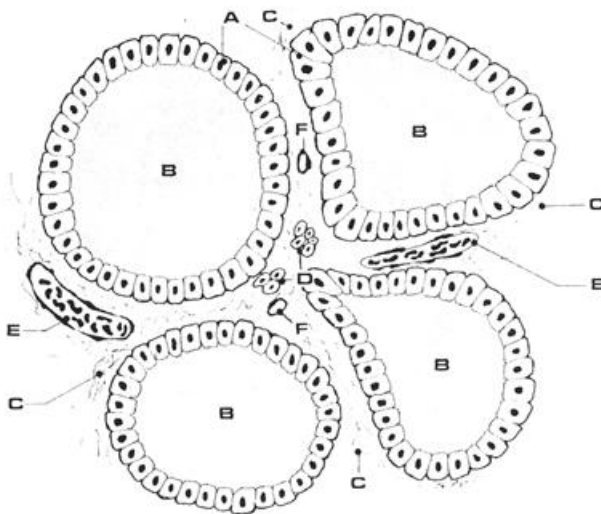


Figura 44-1 La estructura de la glándula tiroides consiste de células foliculares, A; coloide encapsulante, B; y células parafoliculares "C", D, en el espacio intersticial, C. E, Vénula; F, Capilares

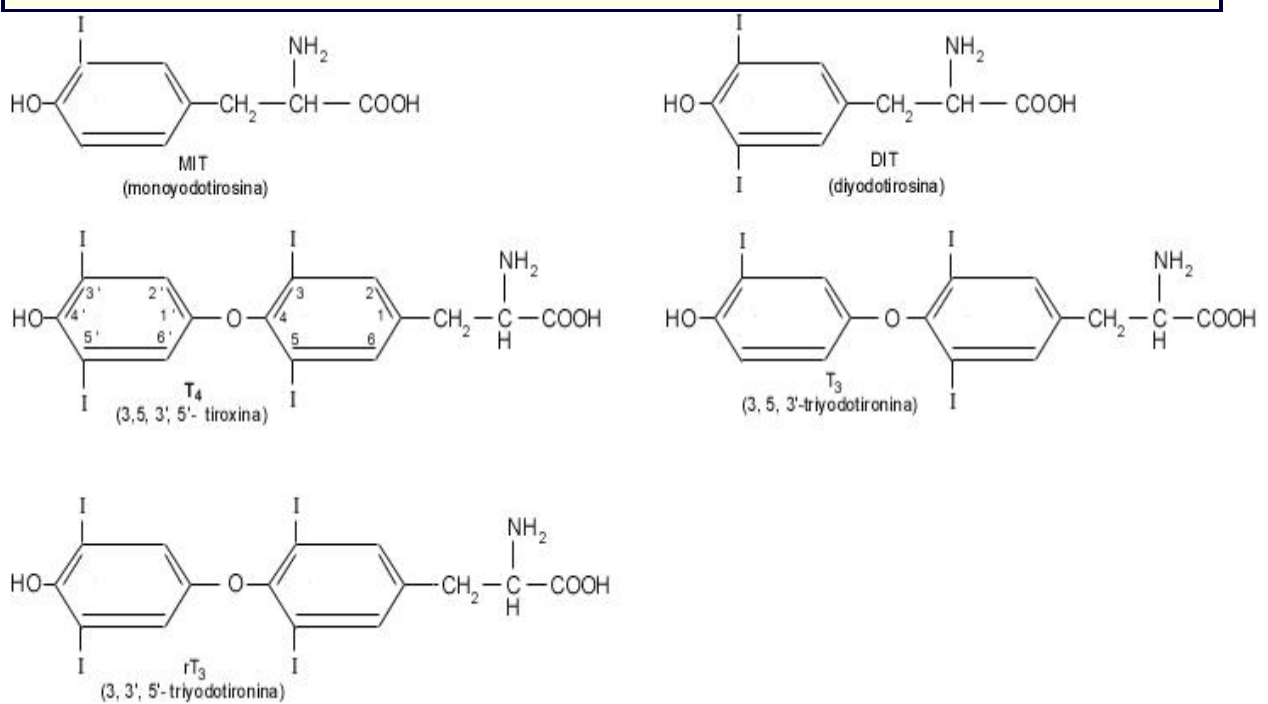


Figura 44-2 Estructura química de las hormonas tiroideas y de sus precursores y metabolitos yodados.

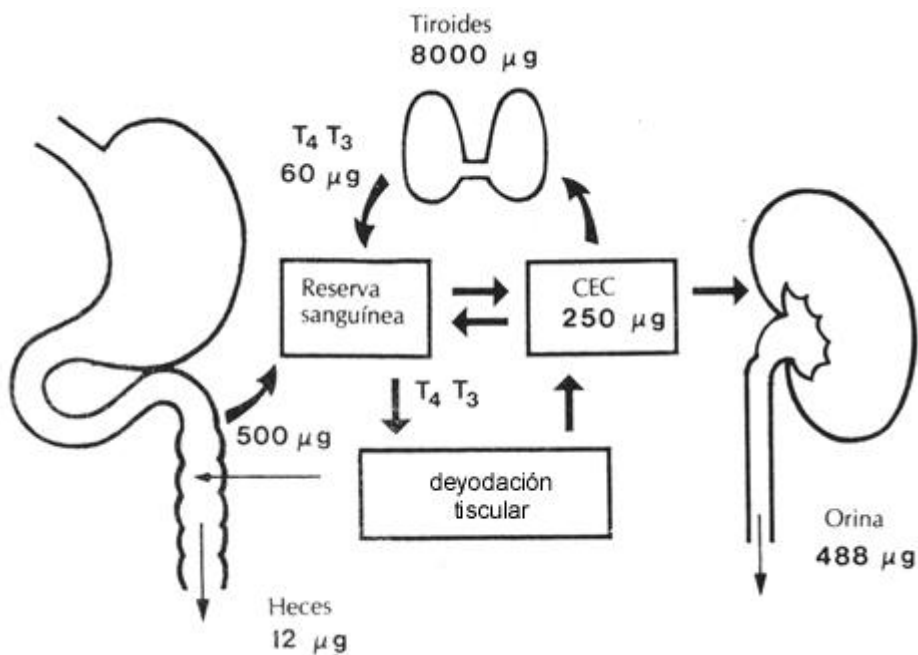


Figura 44-3 Vía metabólica del yodo en un período de 24 horas. ECC, Compartimento

extracelular.

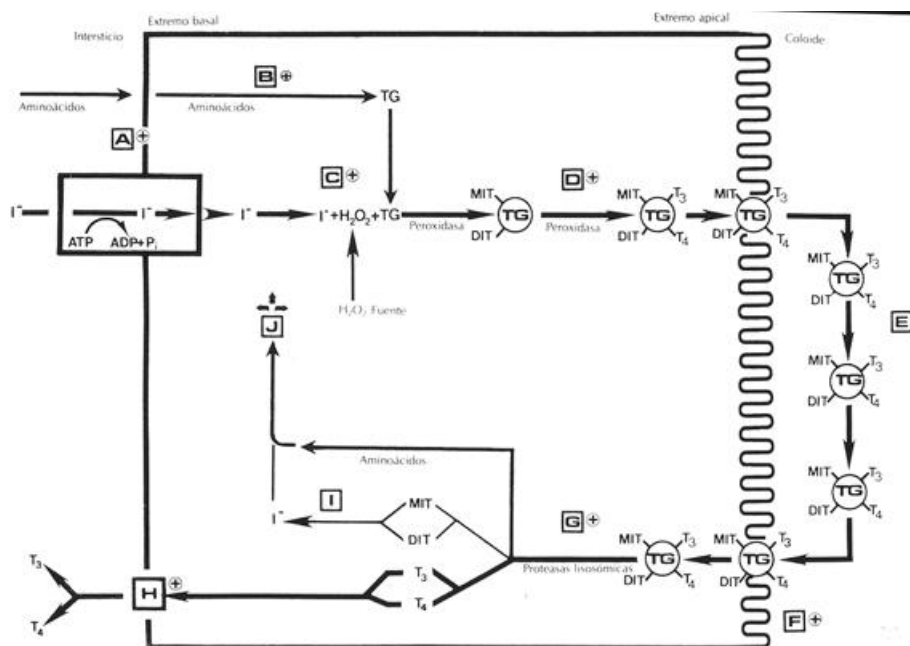


Figura 44-4 Célula tiroidea. El esquema describe los estadios de la hormogénesis tiroidea y el metabolismo intratiroideo de yodo. **A**, Transporte de yodo; **B**, síntesis de tiroglobulina (TG); **C**, organificación del yodo; **D**, acoplamiento oxidativo de intratiroglobulina; **E**, almacenamiento; **F**, endocitosis; **G**, hidrólisis; **H**, secreción hormonal; **I**, deyodación intratiroidea; **J**, recirculación. Los pasos afectados por la hormona tiroideo-estimulante (TSH) están indicados por el símbolo ⊕.

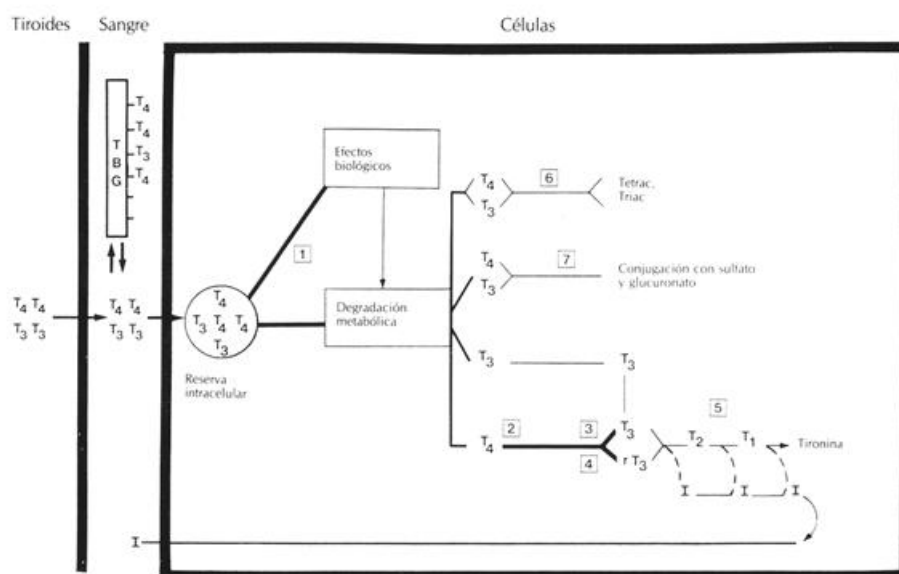


Figura 44-5 Vías metabólicas de la hormona tiroidea. 1, Efectos biológicos a través de la unión a receptores intracelulares; 2, principales vías deconyodativas de T₄; 3, conversión de T₄ a T₃; 4, conversión de T₄ a rT₃; 5, deconyodaciones secuenciales de T₃ y rT₃; 6, vía de deconyoxilación y desaminación; 7, vías conjugativas.

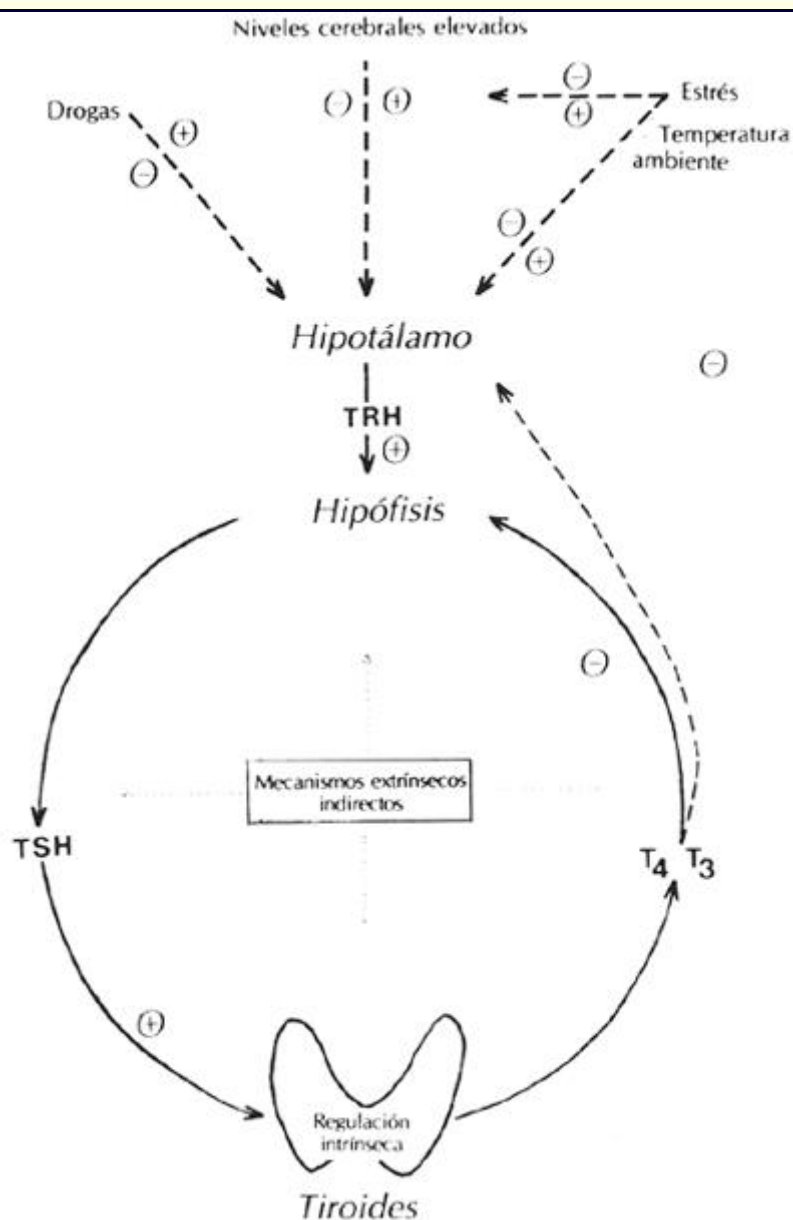


Figura 44-6 Eje hipotálamo-hipófisis-tiroides (EHHT). Efecto de agente estimulador, ⊕, o inhibitorio, —.

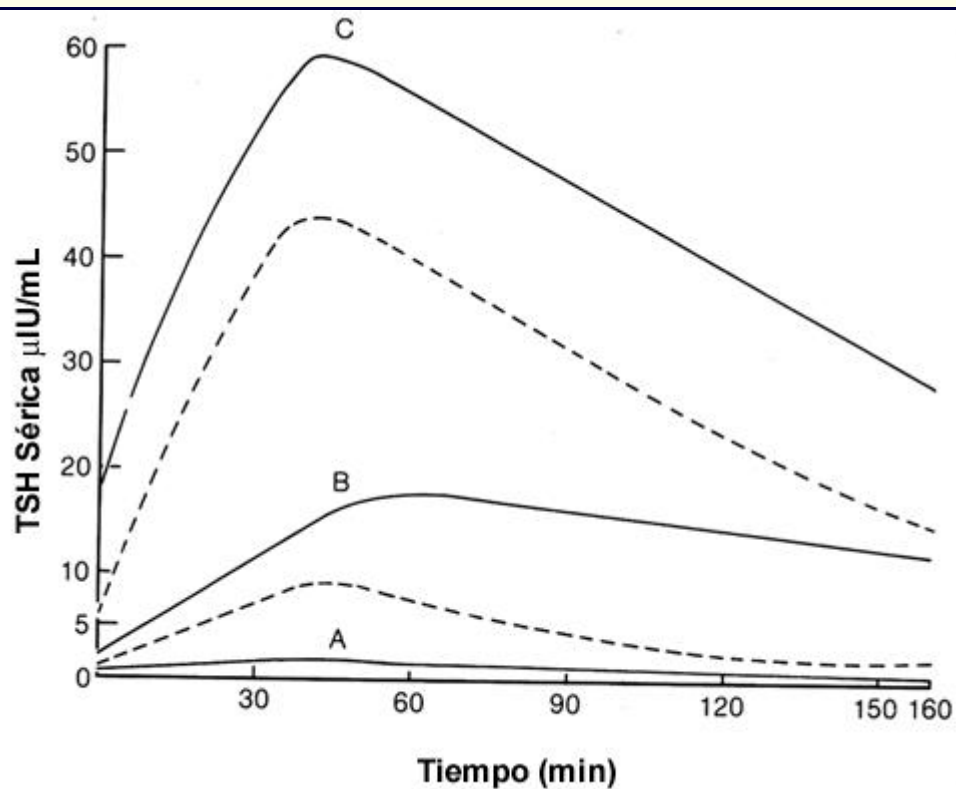


Figura 44-7 Cambios de los niveles séricos de TSH en respuesta a TRH (aplicada al tiempo 0 min). Los rangos superiores e inferiores de respuestas normales se muestran en líneas punteadas. También se muestran los cambios séricos de TSH después del reto con TRH en la pituitaria, A; hipotálamo, B; y enfermedad hipotiroidea primaria, C.



Entidad clínica	Muestra sérica		Exceso de T_3 marcada	GFT en nuevo equilibrio	Hormona fijada a la resina	Pruebas funcionales tiroideas					
	Hormonas libres	Hormona fijada a la GFT				T_4	T_3	FT ₄	T_3 RU	FT ₄ I	GFT
Normal	T_4 T_3 T_4	T_4 T_4 T_3 T_4	T_3 T_3 T_3	T_4 T_4 T_3 T_4	T_4 T_3 T_3	N	N	N	N	N	N
Hipertiroidismo	T_4 T_4 T_3 T_3 T_4 T_4 T_4 T_3	T_4 T_4 T_3 T_4 T_4	T_3 T_3 T_3	T_4 T_4 T_3 T_4 T_4	T_4 T_3 T_3	↑	↑	↑	↑	↑	N, ↓
Hipotiroidismo	T_3 T_4	T_4 T_4 T_3	T_3 T_3 T_3	T_4 T_4 T_3 T_4 T_3	T_4 T_3 T_3	↓	↓	↓	↓	↓	N, ↑
↑ GFT	T_4 T_3 T_4 T_3 T_4	T_4 T_4 T_3 T_4 T_4	T_3 T_3 T_3	T_4 T_4 T_3 T_4 T_3	T_4 T_3 T_3	↑	↑	N	↓	N	↑
↓ GFT	T_4 T_3 T_4 T_3 T_4	T_4 T_4 T_3	T_3 T_3 T_3	T_4 T_4 T_3 T_4	T_4 T_3 T_3	↓	↓	N	↑	N	↓
Desplazamiento de la hormona	T_4 T_3 T_4 T_3 T_4	T_4 T_4 T_3 T_4 T_4	T_3 T_3 T_3	T_4 T_4 T_3 T_4 T_3	T_4 T_3 T_3	↓	↓	N	↑	N	N

Figura 44-8. Interrelaciones entre la GFT (globulina fijadora de tiroxina), IRT₃ y otras pruebas de función tiroidea. D, Fármacos ocupando sitios de unión en la GFT.

CAPÍTULO 45

45. Las Gónadas

Karen L. Nickel

Anatomía

Sistema reproductor masculino: los testículos

Sistema reproductor femenino: los ovarios



Fisiología normal

Masculina

Femenina

Biosíntesis de las hormonas esteroides sexuales

Hormonas esteroides testiculares

Hormonas esteroides ováricas

Transporte y metabolismo

Transporte

Catabolismo y excreción

Condiciones patológicas

Anomalías de la función ovárica

Anomalías de la función testicular

Síndrome pre-menstrual

Dismenorrea

Infertilidad

Desórdenes de la diferenciación sexual

Amenorrea

Fertilidad e infertilidad

Causas de infertilidad femenina

Causas de infertilidad masculina

Evaluación de la pareja infértil

Inducción de la ovulación

Reproducción asistida

Métodos anticonceptivos mediante intervención endocrina

Pruebas funcionales

Pruebas dinámicas en el hombre

Pruebas físicas en el hombre

Pruebas dinámicas en la mujer

Pruebas físicas en la mujer

Alteraciones bioquímicas en los estados patológicos

Gonadotropinas (LH y FSH)

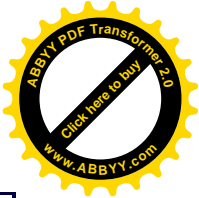
Andrógenos

Estrógenos

Progesterona

OBJETIVOS

- ♦ Descripción del eje hipotalámico-hipofisiario-gonadal y su regulación.
- ♦ Discusión del ciclo menstrual y condiciones patológicas que causan infertilidad.



- ♦ Descripción de la biosíntesis, transporte y excreción de las hormonas sexuales.
- ♦ Discusión de las condiciones patológicas que causan infertilidad.
- ♦ Descripción de los desórdenes de la diferenciación sexual.
- ♦ Evaluación de la pareja infértil.
- ♦ Descripción de las pruebas funcionales en la evaluación de la infertilidad
- ♦ Discusión de los cambios bioquímicos relacionados con desórdenes gonadales.

Términos Clave

amenorrea Ausencia o interrupción anormal de la menstruación.

andrógenos Hormonas esteroides sexuales responsables del desarrollo de las características sexuales masculinas secundarias.

anovulación Incapacidad ovárica de producir óvulos.

anorquia Ausencia congénita de testículos.

anticonceptivos orales Contraceptivos femeninos que impiden la ovulación mediante tratamiento hormonal (generalmente estrógenos y progesterona)

células de Leydig Células intersticiales de los testículos que producen hormonas sexuales masculinas.

criptorquidia Falla en el descenso de los testículos al saco escrotal.

defecto de la fase luteínica Anomalía del cuerpo lúteo del ovario caracterizada por la producción insuficiente de progesterona.

dismenorrea Dolores asociados con la menstruación.

endometrio Capa interna del útero.

epidídimo Estructura alargada y en forma de cordón situada en la parte posterior de los testículos que contiene conductos capaces de albergar a los espermatozoides.

espermatozoide Célula reproductora masculina producida en los testículos.

estrógenos Hormonas esteroides sexuales responsables del desarrollo de las características femeninas sexuales secundarias. El estradiol es el estrógeno biológicamente más activo.

fecundidad Tasa de concepción en una población.

fertilización in vitro (FIV) Método de reproducción asistida en el cual los óvulos son colectados y la concepción se produce fuera del cuerpo de la mujer. Los embriones son posteriormente devueltos a la cavidad uterina o a la trompa de Falopio. Otros métodos de reproducción asistida son TGIT (transferencia genética intratubárica) y TCIT (transferencia cigótica intratubárica).

gametogénesis Desarrollo de las células sexuales masculinas y femeninas o gametos.

ginecomastia Aumento de tamaño de carácter benigno de la mama masculina.

globulina fijadora de hormonas sexuales Proteína producida en el hígado que se une y transporta testosterona y estradiol en la circulación.



gonadotropinas Hormonas proteicas (FSH y LH) secretadas por la hipófisis que estimulan a las gónadas.

hirsutismo Aumento indeseable del vello corporal en la mujer.

hipogonadismo Actividad gonadal anormalmente baja.

hormona liberadora de gonadotropinas Decapéptido hormonal producido por el hipotálamo que estimula la adenohipófisis para producir gonadotropinas.

infertilidad Incapacidad de concebir después de un año o mas de coito sin protección.

menarca Inicio de las menstruaciones.

menopausia (climaterio) Cesación del periodo reproductivo de la mujer adulta.

menstruación Sangrado cíclico uterino que ocurre aproximadamente cada 28 días durante el periodo reproductivo de la mujer.

ovulo Célula reproductora femenina producida en el ovario.

seudohermafroditismo Condición en la cual las gónadas son de un sexo pero la morfología es del sexo opuesto.

síndrome de Klinefelter Anomalía sexual en el hombre caracterizada por un cromosoma x adicional, características cromatínicas femeninas (xxy), pero morfología masculina.

síndrome de los ovarios poliquísticos (Síndrome de Stein-Levanthal)

Condición caracterizada por ovarios poliquísticos bilaterales, amenorrea y anovulación.

síndrome pre-menstrual (PMS) Cambios de comportamiento asociados con el ciclo sexual. Se le conoce más ampliamente por sus siglas en inglés, PMS.

testosterona La mas importante hormona sexual masculina.

trompas de Falopio Estructuras tubulares delgadas que se extienden desde el útero hacia el ovario.

virilismo Desarrollo de características sexuales secundarias masculinas en la mujer.

Anatomía

Anatomía del sistema reproductor masculino: los testículos

Los testículos normales maduros (Fig 45-1) contienen aproximadamente 250 lobulillos piramidales de túbulos seminíferos, los cuales están separados por septos fibrosos. Los túbulos constituyen el 85% del volumen de los testículos. Rodeando la luz central de los túbulos seminíferos se encuentra un epitelio organizado constituido por las células de Sertoli y las células espermatogénicas. El tejido intersticial entre los túbulos contiene las células de Leydig que son las responsables de la producción testicular de andrógenos.

Los testículos en el adulto son órganos ovoides aplanados localizados dentro del escroto. El escroto les sirve como cubierta protectora y a la vez ayuda a mantener la temperatura de los testículos aproximadamente 2 grados Celsius por debajo de la temperatura abdominal. Cada testículo cuenta con aproximadamente 250 lobulillos piramidales que a su

vez contienen los túbulos seminíferos que constituyen el 80 a 90% de la masa testicular. En el tejido intersticial que rodea y separa los túbulos se encuentran aproximadamente 350 millones de células de Leydig (productoras de andrógenos) así como fibroblastos, vasos sanguíneos, vasos linfáticos y nervios. La célula de Leydig constituye el mayor componente endocrino de los testículos. El producto secretorio primario de estas células, la *testosterona*, es responsable de la diferenciación de las características masculinas en el embrión, del desarrollo de las características sexuales masculinas en la pubertad y del mantenimiento de la libido y potencia sexual en el adulto. Los túbulos seminíferos producen aproximadamente 30 millones de espermatozoides al día durante la vida reproductiva del hombre. Ambos componentes, endocrino y espermatogénico, están relacionados y los dos requieren de un eje hipotalámico-hipofisiario intacto para la iniciación y el mantenimiento de sus funciones (ver el capítulo 43). Además, varias estructuras genitales accesorias, que se discutirán mas adelante, son necesarias para la maduración funcional y el transporte de los espermatozoides.

Los túbulos seminíferos están revestidos internamente por células de Sertoli y células germinales. La producción de células germinales ocurre aproximadamente después de 74 días de desarrollo ordenado dando lugar a los espermatozoides maduros. Los túbulos seminíferos se vacían en un complejo sistema de conductos replegados llamados *rete testis*. Los espermatozoides son luego transportados a un conducto único, el *epidídimo*. Durante los 12 días que dura este transporte, los espermatozoides sufren cambios morfológicos y funcionales que son esenciales para la fertilización. El epidídimo además sirve como embalse del esperma que será mas tarde vaciado en el conducto deferente y luego en el conducto eyaculador.

Además de recibir los espermatozoides y productos secretorios de los testículos, los *conductos eyaculadores* reciben el fluido seminal de las *vesículas seminales*. Las vesículas seminales son órganos glandulares productores de *fructosa* seminal, que sirve como fuente de energía para los espermatozoides, así como *fosforilcolina*, *ácido ascórbico* y *prostaglandinas*. Alrededor del 60% del volumen del líquido seminal deriva de las vesículas seminales. Los conductos eyaculadores desembocan en la uretra prostática. Aproximadamente 20% de fluido seminal es agregado por la *glándula prostática*. Los constituyentes del fluido prostático incluyen *espermina*, *ácido cítrico*, *fibrinolisisina*, *antígeno prostático específico* y *fosfatasa ácida*. Fluido adicional es agregado al líquido seminal por las glándulas de Cowper y las glándulas periprostáticas durante su tránsito a través de la uretra peneana.

Anatomía del sistema reproductor femenino: los ovarios

Los ovarios maduros son órganos pares, nodulares, que pesan de 4 a 8 gramos cada uno y varían durante el ciclo sexual. Los ovarios se encuentran en proximidad de las trompas uterinas (también llamadas oviductos o trompas de falopio) y están unidos al útero por medio de los ligamentos ováricos.

Los ovarios tienen dos funciones fundamentales: (1) la *producción de óvulos* y (2) la *secreción de las hormonas sexuales femeninas estrógeno y progesterona*. El oocito, la célula germinal del ovario, es la célula mas grande del cuerpo con un diámetro de aproximadamente 100 μm en el momento de la ovulación. A diferencia de los testículos que continúan la producción de espermatozoides durante toda la vida del hombre, los ovarios contienen el numero completo de oocitos en el momento del nacimiento. De todas formas, solamente alrededor de 400 oocitos completan el complejo proceso de maduración y ovulación, quedando mas de 400,000 oocitos inmaduros en los folículos sin usar. Durante la vida

reproductiva de la mujer, se produce una degeneración y privación gradual de oocitos hasta la menopausia, cuando la provisión esta prácticamente agotada.

El folículo maduro esta compuesto de tres capas de células, *la teca externa, la teca interna y la capa de células de la granulosa* (Fig. 43-2). Las células de la teca interna son la principal fuente de estrógenos. El sangrado que se produce inmediatamente después de la ruptura del folículo y la liberación del óvulo (ovulación) lleva a la formación del *cuerpo hemorrágico*. Las células de la granulosa y de la tecas comienzan a proliferar dando lugar al *cuerpo lúteo* o *cuerpo amarillo*. Las células luteínicas secretan los estrógenos, estrona y estradiol, y progesterona. Si no se produjo el embarazo, el cuerpo lúteo comienza a degenerar aproximadamente 4 días antes de la menstruación y es posteriormente reemplazado por un tejido fibroso cicatricial llamado *cuerpo albicante* o *cuerpo blanco*. La fertilización del óvulo se produce dentro de la trompa de falopio. El óvulo fertilizado es luego transportado hasta la cavidad uterina para implantarse en el endometrio.

Fisiología Normal

Hombre

Tanto en el hombre como en la mujer, toda la función reproductora depende de una compleja relación entre el hipotálamo, la hipófisis y las gónadas. El hipotálamo sintetiza un decapeptido, la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) que es secretada de forma pulsátil cada 2 minutos. Después de alcanzar la hipófisis anterior, esta hormona liberadora de gonadotropinas estimula la liberación de hormona luteinizante (LH) y, en menor grado en el varón, de hormona folículo-estimulante (FSH), a la circulación general.

En el hombre la LH se une a unos receptores de membrana específicos en las células de Leydig. Esto lleva a la generación de cAMP y otros mensajeros que finalmente resultan en la secreción de andrógenos, las hormonas masculinas. El producto endocrino primario de estas células es la hormona sexual masculina testosterona. El aumento de andrógenos a su vez inhibe la secreción de LH por la hipófisis por medio de un mecanismo de retroalimentación negativa que actúa tanto sobre la hipófisis como sobre el hipotálamo. Ambos, la hipófisis y el hipotálamo, cuentan con receptores de andrógenos. Las células de Leydig también producen pequeñas cantidades de sustancias bioactivas como la *oxitocina, prostaglandinas y endorfinas*, las cuales pueden ser importantes en la regulación de la función testicular. La testosterona, liberada por las células de Leydig, es responsable de la diferenciación masculina del embrión, del desarrollo de las características sexuales secundarias en la pubertad y del mantenimiento de la libido y la potencia sexual en el hombre adulto.

La FSH hipofisiaria se une a receptores específicos de membrana de las células de Sertoli, estimulando la producción de la proteína fijadora de andrógenos (ABP), la FSH es necesaria para la iniciación de la espermatogénesis. La maduración final de los espermatozoides también requiere de testosterona. La acción principal de la FSH en la espermatogénesis podría ser la estimulación de la producción de la proteína fijadora de andrógenos (ABP) que a su vez mantiene el nivel necesario de testosterona.

Las células de Sertoli producen, además de la proteína fijadora de andrógenos, muchas otras sustancias como transferrina, inhibina, ceruloplasmina y antígeno H-Y. La *inhibina* tiene dos formas, ambas tienen en común la subunidad alfa que está unida a las subunidades beta que son diferentes. Ambas inhibinas inhiben selectivamente la liberación hipofisiaria de FSH



sin afectar la liberación de LH. Ya que la FSH directamente estimula las células de Sertoli para secretar inhibina, las inhibinas (y posiblemente los esteroides gonadales) son probablemente los reguladores fisiológicos de la secreción hipofisiaria de FSH.

Mujer

La estructura y la actividad hormonal de los ovarios están continuamente cambiando durante los años reproductivos de la mujer. Estos cambios son los responsables de los eventos fisiológicos del ciclo menstrual normal. Las dos funciones principales de los ovarios de la mujer adulta son la síntesis y secreción de hormonas sexuales y la liberación de un óvulo maduro cada 28 a 30 días. Estas dos funciones están estrechamente relacionadas y son parte del ciclo menstrual descrito mas adelante.

El ovario.

La unidad reproductiva básica del ovario es el folículo primordial que consiste en un pequeño oocito arrestado en el etapa de diplotene de la profase meiótica. Estos folículos en reposo constituyen la fuente a partir de la cual todos los folículos que llegarán a la ovulación se desarrollan. Cada mes después de la pubertad, un folículo deja el etapa de reposo y comienza a agrandarse. Factores locales desconocidos podrían jugar un papel en la selección pre-ovulatoria del folículo dominante. Este oocito comienza un proceso de crecimiento llevando al desarrollo de un óvulo maduro que es liberado durante la ovulación. Este proceso depende de la interacción de las gonadotropinas hipofisiaria, los esteroides ováricos y otros factores locales dentro del folículo. La unión de la FSH a su receptor ovárico estimula la conversión de precursores androgénicos a estrógenos. El estradiol a su vez juega un papel fundamental en el crecimiento folicular por su acción directa sobre el ovario y el mecanismo de retroalimentación positivo-negativo en la secreción de FSH y LH (ver más adelante).

Inmediatamente después de la ovulación se producen cambios celulares importantes en el área de la ruptura del folículo, estos cambios, que van mas allá de la reparación normal del tejido, llevan a la formación del cuerpo lúteo. El cuerpo lúteo dura aproximadamente 14 días que corresponden a la fase luteínica del ciclo menstrual durante la cual los niveles de LH se mantienen bajos. Si se produce la implantación del óvulo fertilizado la LH es reemplazada por la gonadotropina coriónica humana (GCH) que es secretada por las células trofoblásticas y el cuerpo lúteo se mantiene. Si no ocurre el embarazo el cuerpo amarillo rápidamente degenera y ocurre la menstruación (ver pág. 896).

Hormonas ováricas.

El ovario maduro activamente sintetiza y secreta estrógenos (estradiol y estrona), progesterona, andrógenos y sus precursores. El estrógeno ovárico biológicamente mas activo es el estradiol. El ovario ademas produce *relaxina*, *inhibina*, *prostanglandinas* y otras sustancias. El ovario es normalmente la mayor fuente de estrógenos aunque la conversión de andrógenos y sus precursores a estrógenos en otros tejidos puede ser clínicamente importante después de la menopausia o en las disfunciones ováricas. La *progesterona* es producida en grandes cantidades durante la fase luteínica del ciclo menstrual. El ovario también produce pequeñas cantidades de testosterona y otros andrógenos que actúan periféricamente y a la vez sirven como precursores para la síntesis de estrógenos. La *estrona*, otro estrógeno importante, es el producto de ambos, secreción ovárica y conversión periférica de

pro-hormonas provenientes de la glándula suprarrenal y del ovario.

Ciclo menstrual.

Las funciones cíclicas del ovario dependen de la sincronizada secreción de FSH y LH por la hipófisis anterior en respuesta a la GnRH hipotalámica. La liberación de GnRH por el hipotálamo que a su vez lleva a la secreción hipofisiaria de FSH y LH son reguladas por el estrógeno y la progesterona que llegan a estas glándulas. Tanto la retroalimentación positiva como negativa son esenciales para la coordinación apropiada de los eventos morfológicos y endocrinos en el ciclo reproductivo de la mujer adulta. (Fig. 45-3). La retroalimentación negativa consiste en la supresión de la secreción de FSH y LH en respuesta a los niveles elevados de estradiol y progesterona. El estradiol parece inhibir fundamentalmente la secreción de FSH mientras que la progesterona en combinación con el estradiol parecen reducir la secreción de ambas LH y FSH. La retroalimentación positiva consiste en la estimulación de la síntesis y liberación de la LH hipofisiaria por el estradiol.

El ciclo ovárico o menstrual normal es regulado por el mecanismo de retrocontrol hipotalámico-hipofisiario-ovárico y puede ser dividido en cuatro fases: *fase folicular temprana*, *fase folicular tardía*, *fase media* y *fase luteínica*.

El estradiol parece ser el agente mas efectivo en la retroalimentación negativa que inhibe la liberación de FSH. Si los niveles de estradiol caen, la secreción de FSH aumenta rápidamente. Esto sucede al inicio de la menstruación cuando el cuerpo amarillo deja de secretar estradiol y A su vez los niveles de FSH caen durante la segunda mitad de la fase folicular cuando el folículo maduro secreta cantidades crecientes de estradiol e inhibina y durante la fase luteínica. El efecto del estradiol en la producción de LH no es tan sencillo ya que puede haber un efecto concentración-dependiente.

La regulación hipotalámica-hipofisiaria de la función ovárica es gobernada no solamente por hormonas esteroides y péptidos sino también por estímulos provenientes del sistema nervioso central. El hipotálamo recibe tanto señales nerviosas como hormonales, las cuales son traducidas por el hipotálamo con la secreción de GnRh que puede afectar el ciclo menstrual. Esto se ve por ejemplo en casos de estrés o exagerada pérdida de peso, los cuales pueden producir amenorrea.

La fisiología de la reproducción en la mujer es gobernada por los eventos del ciclo menstrual. La *menstruación* es el desprendimiento y eliminación cíclico y regular de la capa superficial del endometrio junto con sangre. Este fenómeno cíclico es el resultado de la interacción hormonal que hemos ya descrito.

Al comienzo del ciclo menstrual, en la fase folicular, varios folículos comienzan a desarrollarse, pero solamente uno llegará a madurar en 10 a 12 días. En la fase folicular temprana, cuando el cuerpo amarillo del mes anterior cesa de funcionar, los niveles de estradiol y progesterona se mantienen relativamente constantes y bajos, los niveles de FSH comienzan a elevarse y los niveles de LH son bajos (Fig. 45-3). Los niveles elevados de FSH estimulan el crecimiento folicular y la producción de estradiol. El nivel de estradiol va aumentando rápidamente llegando a su primer pico antes de la ovulación en los días 7 a 8. Los niveles elevados de estradiol producen un retrocontrol negativo sobre el hipotálamo y la hipófisis lo que lleva a una disminución en los niveles de FSH. Al mismo tiempo el aumento de estradiol produce un aumento rápido de LH a través de un mecanismo de retrocontrol positivo. El estradiol llega a su pico máximo el día antes del pico de LH.



En la mitad del ciclo se produce el pico de LH, esto lleva a la maduración final y ruptura del folículo durante la ovulación, generalmente 16 a 24 horas después del pico de la LH. Esto usualmente sucede el día 14 de un ciclo de 28 días. Antes del pico de la LH y de la ovulación el nivel de estradiol baja considerablemente para volver a subir después de la ovulación.

Después de la ovulación el folículo se transforma en cuerpo lúteo y se dice que el ovario se encuentra en la fase luteínica. La progesterona producida por el cuerpo lúteo comienza a elevarse 3 días después de la ovulación, estos niveles elevados de progesterona inhiben la secreción de LH. Los niveles de progesterona siguen elevándose y llegan a un pico máximo 8 a 9 días después del pico de LH (día 23 a 25 del ciclo). A medida que los niveles de estradiol y progesterona se elevan durante la fase luteínica, los niveles de FSH y LH van declinando y estos niveles bajos de FSH causan la regresión del cuerpo lúteo. A medida que el cuerpo lúteo se va degenerando, los niveles de estradiol y progesterona comienzan a disminuir. Al no existir más el efecto inhibitorio del estradiol y la progesterona la FSH comienza a elevarse nuevamente, esto estimula el crecimiento de un nuevo grupo de folículos en los ovarios. Durante la fase menstrual, el estradiol, la progesterona y la LH se mantienen en niveles constantes y bajos, la FSH es la única hormona que se encuentra a niveles elevados y crecientes.

Efectos de las hormonas ováricas en el útero (endometrio).

Cambios definidos para preparar la implantación del óvulo fecundado ocurren en el endometrio como resultado fisiológico de la estimulación por las hormonas ováricas estradiol y progesterona. Los niveles crecientes de estradiol estimulan la reconstrucción de las glándulas y vasos sanguíneos del endometrio. Este cambio en el crecimiento endometrial se llama *fase proliferativa* y corresponde a la fase folicular del ovario. Las glándulas nuevamente formadas comienzan luego a liberar sus productos de secreción. Entonces comienza la *fase secretoria* del endometrio que corresponde a la fase luteínica del ovario. Durante los días 1 a 5 del ciclo la cantidad de estrógeno que se libera a nivel folicular es suficiente para mantener el crecimiento de la capa endometrial profunda, pero insuficiente para mantener el endometrio secretor engrosado durante la fase secretoria del ciclo anterior. Como resultado la capa superficial del endometrio se desprende a medida que los niveles de estradiol disminuyen. Este proceso se denomina menstruación. De esta manera la menstruación ocurre en la etapa tardía de la fase secretoria del endometrio como consecuencia de la interrupción del suministro hormonal. Si se produce la implantación del óvulo fecundado en el endometrio engrosado, el proceso de implantación determina una producción adicional de estrógenos y la menstruación no se produce. El embarazo, de esta manera, se inicia. (ver capítulo 40).

Menopausia.

Los cambios cíclicos hormonales del eje hipotalámico-hipofisiario-ovárico (Fig. 45-4) ocurren por 30 a 35 años después de la menarca. A medida que la mujer se va acercando a la edad de la menopausia los folículos que quedan comienzan a disminuir su funcionamiento. Durante el período de la “peri-menopausia”, llamado el *climaterio*, los niveles de estradiol van disminuyendo y los niveles de FSH son elevados, a pesar de eso la mujer puede seguir teniendo ciclos regulares. Los niveles de LH se mantienen invariables. Esta meseta se debe probablemente a la disminución del efecto negativo de la inhibina en la producción de FSH por

1835



la hipófisis. Los mayores disturbios que se producen en este período incluyen anovulación, disminución de la fertilidad, disminución (o aumento) del flujo menstrual y frecuencia irregular de la menstruación. Ocasionalmente un cuerpo lúteo funcional se produce, de este modo la mujer en el período de la peri-menopausia no está a salvo de un embarazo inesperado hasta que niveles elevados de ambas LH y FSH puedan ser demostrados.

Después de la menopausia, generalmente entre los 48 y los 55 años de edad para la mujer americana, no quedan mas folículos, la producción de estrógenos es inadecuada y no se producen mas menstruaciones. Los niveles de FSH aumentan 10 a 20 veces y los niveles de LH aumentan 3 veces, llegando a sus picos aproximadamente 3 años después de la menopausia. Los niveles de FSH son mas elevados que los de LH porque la LH es eliminada de la sangre mucho mas rápidamente que la FSH (la vida media de la FSH en la sangre es de 4 horas y la de la LH es de 30 minutos). La producción de estradiol no continúa después de la menopausia, de todas formas los niveles de estrógenos pueden ser significativos por la conversión periférica de andrógenos a estrógenos. El estrógeno mas importante en la mujer menopáusica es la estrona, no el estradiol.

Biosíntesis de las Hormonas Esteroides

Hormonas esteroides testiculares

El precursor final de todas las hormonas esteroides es el acetato, a partir del cual el colesterol es sintetizado. El colesterol puede ser producido a partir del acetato en las gónadas o puede derivar de la circulación sistémica. La conversión del colesterol (un esteroide C27) a andrógenos (C19) y estrógenos (C18) es demostrada en la Fig. 45-5. Estas vías metabólicas son similares en los testículos, ovarios y glándulas suprarrenales. El primer paso es la ruptura de la cadena lateral del colesterol resultando en la formación de pregnenolona, un esteroide C21. La pregnenolona es después convertida a través de una serie de productos intermedios a testosterona o estradiol. La vía a través de la progesterona se llama vía Δ^4 , y la vía a través de la DHEA se llama vía Δ^5 . En el hombre, la testosterona es adicionalmente reducida a DHT, androstanolona y androstanediol en algunos tejidos como la próstata.

El testículo es el sitio primario de producción de andrógenos en el hombre, y el andrógeno circulante mas importante es la testosterona. Por definición, los andrógenos son hormonas esteroides capaces de estimular el desarrollo y mantener el normal funcionamiento de los órganos sexuales masculinos. Hay muchos otros andrógenos además de la testosterona, como por ejemplo la androstenediona y la dehidroepiandrosterona (DHEA), que son andrógenos débiles, y la 5α -dihidrotestosterona (DHT), que es un andrógeno potente. La 5α -reductasa es una enzima clave en la conversión de la testosterona a la mas potente DHT. Inhibidores farmacológicos específicos de la 5α -reductasa (por ejemplo Proscar) son usados en el tratamiento de la hipertrofia prostática benigna y el cáncer de próstata ya que ambas condiciones son estimuladas por la testosterona y la DHT. Los testículos también secretan otros esteroides como el estradiol y la 17-hidroxiprogesterona, esta última es la segunda hormona mayor producida en los testículos. La secreción de testosterona por el testículo es episódica; un ritmo circadiano puede ser demostrado con un máximo a la mañana temprano (alrededor de las 7 AM) y un mínimo aproximadamente 13 horas mas tarde.



Hormonas esteroideas ováricas

El ovario es la mayor fuente de estrógeno y progesterona en la mujer, como antes de ya descrito. El estradiol, el estrógeno mas activo producido, es sintetizado a partir de andrógenos por un grupo de enzimas microsomales conocidas como el *sistema aromatizante*. La progesterona sirve como precursor de andrógenos y estrógenos, dependiendo de la ruptura de la cadena lateral de dos carbonos (C20-C21). La actividad secretoria está estrechamente relacionada con la actividad biosintética ya que muy poca cantidad de hormona es normalmente almacenada en el ovario. Durante el embarazo, la unidad fetoplacentaria produce gran cantidad de hormonas esteroideas como progesterona, pregnenolona y estriol (ver capítulo 40).

Transporte y Metabolismo

Transporte

Una vez secretadas a la circulación, las hormonas esteroideas gonadales existen en forma libre (no unidas a proteínas plasmáticas de transporte), débilmente unidas a las proteínas transportadoras, y fuertemente unidas a las proteínas transportadoras. Solamente la fracciones libres y débilmente unidas a las proteínas de transporte son biológicamente activas. Las proteínas plasmáticas transportadoras mas importantes son albúmina y una beta globulina llamada *globulina fijadora de hormonas sexuales* (GFHS). Aproximadamente 97% del estradiol y 60% de la testosterona se unen a la GFHS y 38% de la testosterona se une a la albúmina. De esta manera, solamente 3% del estradiol y 2% de la testosterona permanecen de forma libre y activa en el plasma. La GFHS, sintetizada en el hígado, se encuentra bajo regulación hormonal y es diferente de la proteína fijadora de andrógenos (PFA), la cual es producida por las células de Sertoli en los testículos. La progesterona se une fuertemente a la globulina fijadora de corticosteroides (GFC) y solo débilmente a la albúmina. Los estrógenos y la tiroxina incrementan la concentración de las proteínas fijadoras mientras que los andrógenos y la progesterona la disminuyen. La unión a las proteínas fijadoras es un modo de controlar la disponibilidad biológica de las hormonas activas, ya que solamente la fracción libre de las hormonas puede penetrar dentro de las células. Alteraciones en las proteínas fijadoras pueden tener importancia después de la menopausia o en mujeres con disfunción ovárica asociada con exceso de andrógenos.

Catabolismo y excreción

A pesar que la testosterona es convertida a DHT en algunos tejidos, el hígado es el principal órgano para el catabolismo de las hormonas sexuales. La testosterona plasmática es convertida en el hígado en varios metabolitos como androstenerona y eticolanolona, las cuales después de su conjugación con ácidos glucorónico y sulfúrico, son excretadas en la orina como 17-cetosteroides. Es importante recordar, sin embargo, que solamente el 25% de los cetosteroides urinarios derivan de la testosterona. La mayor parte, como el sulfato de DHEA, derivan del metabolismo esteroide adrenal. El estradiol circulante es rápidamente convertido a estrona en el hígado, una parte de la cual entra nuevamente a la circulación. Sin embargo, la mayor parte es posteriormente metabolizado a estriol o 2-hidroxiestrona, un catecol estrógeno, luego es conjugado y después excretado por los riñones. La progesterona



tiene una vida media de aproximadamente 5 minutos y es rápidamente eliminada mediante la conversión hepática a pregnanediol, la conjugación con ácido glucorónico y la eliminación por vía renal.

Condiciones Patológicas

Las anomalías en la función gonadal pueden manifestarse como una variedad de alteraciones patológicas. Algunas de estas condiciones pueden resultar incluso en la muerte, mientras otras, como el hirsutismo, no acarrearán peligro de muerte. Una de las manifestaciones clínicas más importantes de muchas anomalías gonadales es la infertilidad. Este problema clínico es discutido en una sección separada más adelante.

Anomalías de la función ovárica

Los desórdenes endocrinos del ovario pueden ser clasificados como “hipo-” o “hiper-”; primarios (de origen ovárico) o secundarios a alteraciones del eje hipotalámico-hipofisiario; y congénitos o adquiridos. Las manifestaciones clínicas de las alteraciones ováricas pueden ser muy poco evidentes ya que el ovario es principalmente un órgano de reproducción. Estas alteraciones suelen ser descubiertas durante evaluaciones por infertilidad o por pubertad precoz o retardada. (Ver la discusión de infertilidad y fertilidad, págs. 901 y 904.)

Hipofunción ovárica.

Los síntomas de hipofunción gonadal dependen de si esta condición se manifiesta antes o después de la pubertad. En el periodo pre-puberal la hipofunción ovárica se manifestará clínicamente con retardo o ausencia de la menarca o amenorrea primaria. Después de la pubertad, la hipofunción ovárica puede manifestarse como amenorrea secundaria.

Hipofunción ovárica primaria. Los desórdenes ováricos primarios pueden ser causados por anomalías funcionales o del desarrollo de la gónada. El síndrome del ovario resistente, la falla ovárica precoz y los tumores ováricos pueden todos resultar en pérdida de la función ovárica. Anomalías del desarrollo se pueden ver en casos de agenesia gonadal, síndrome de Turner y deficiencia de la 17α -hidroxilasa. Debido a la ausencia de retrocontrol estrogénico sobre el eje hipotalámico-hipofisiario, la hipofunción ovárica primaria se caracteriza por aumento de los niveles de gonadotropinas y disminución de los niveles de estrógenos.

Un ejemplo fisiológico de hipofunción ovárica es el climaterio femenino o menarca que resulta en la *menopausia*. El climaterio normalmente comienza a ocurrir en mujeres de alrededor de 50 años, y en pocos años resulta en el cese completo del ciclo menstrual (menopausia). El climaterio es el resultado de una hipofunción ovárica primaria a pesar de existir elevados niveles de LH. Cierta grado de incomodidad física y psicológica pueden acompañar este cese de actividad estrogénica durante el climaterio. Además, la falta de estrógenos a largo plazo aumenta el riesgo de osteoporosis y enfermedades del corazón, y la disminución de progesterona aumenta el riesgo de cáncer de mama. Por esta razón, la mayoría de las mujeres americanas reciben tratamiento con estrógenos exógenos durante la menarca y continúan el tratamiento por muchos años más.



Hipofunción ovárica secundaria. La hipofunción ovárica secundaria se caracteriza por disminución de los niveles de estrógenos y progesterona en asociación con disminución de los niveles de gonadotropinas. Esto puede atribuirse a alteraciones hipotalámicas, hipofisarias o constitutivas.

La falla ovárica secundaria ocurre cuando la hipófisis no produce FSH y LH en respuesta ya sea a la estimulación con GnRH o a los niveles decrecientes de estrógenos. La causa mas común de hipofunción hipofisaria es el trauma hipofisario (injuría accidental o quirúrgica), en el cual la producción de gonadotropinas es generalmente la primera función que se pierde. Los tumores de la hipófisis y la necrosis hipofisaria secundaria a hemorragias post-parto también resultan en hipofunción hipofisaria.

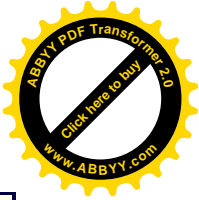
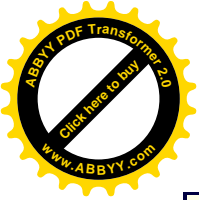
Anormalidades funcionales en los mecanismos nerviosos que regulan la secreción pulsátil de GnRH pueden producir amenorrea hipotalámica (*amenorrea terciaria*). En estos casos, las funciones hipofisarias y ováricas pueden ser normales, pero alguna condición especial como estrés emocional o enfermedad física pueden alterar la secreción de LHRH y la ovulación normal. Amenorrea puede también verse en atletas y en personas que sufren de anorexia.

Existen algunas pruebas de laboratorio que pueden ser usadas para diferenciar amenorreas ováricas (primarias), hipofisarias (secundaria) e hipotalámica (terciaria) en la mujer (véase mas adelante). Se puede demostrar la presencia de estrógenos endógenos induciendo el sangrado uterino con la administración de progesterona. La presencia de sangrado vaginal dentro de 7 días después de haber parado el tratamiento con progesterona indica que la paciente es capaz de producir suficiente estrógenos para estimular el crecimiento endometrial. La paciente aún en este caso podría ser anovulatoria, y el método de tratamiento dependerá de sus objetivos. La falla para producir sangrado con el tratamiento progesteronico indica insuficiente producción de estrógenos secundaria a una disfunción del eje hipotálamo-hipófisis- ovárico. Análisis de los niveles de FSH y LH y la prueba con estimulación de GnRH pueden ayudar a diferenciar las causas de amenorrea secundaria y terciaria. La prueba de la prolactina (PRL) es el método de primera elección para el diagnóstico de un tumor hipofisario como causa de amenorrea.

Hiperfunción ovárica.

Hiperfunción ovárica primaria. La causa principal de hiperfunción ovárica primaria son los tumores secretores de estrógenos como los tumores de la granulosa y teca. Aproximadamente 5% aparecen antes de la pubertad, 55% durante el período de vida reproductiva, y 40% después de la menopausia. Los tumores que aparecen en el período pre-puberal se manifiestan con pubertad precoz o sangrado uterino intermitente. En el período de vida reproductiva activa la manifestación mas común es sangrado irregular a menudo alternante con períodos de amenorrea. El sangrado uterino es la manifestación característica de los tumores que aparecen durante la post-menopausia. La hiperfunción ovárica se caracteriza por niveles bajos de FSH y LH debido al retrocontrol negativo sobre el eje hipotalámico-hipofisario.

Hiperfunción ovárica secundaria. La hiperfunción ovárica secundaria se caracteriza por elevados niveles de gonadotropinas que a su vez producen un aumento en la secreción de estrógenos. Precocidad sexual es el resultado de esta estimulación hipofisaria de la función ovárica.



Existe una forma inusual de pubertad precoz que se asocia con hipotiroidismo en la que los ovarios son muy sensibles a las gonadotropinas endógenas. La precocidad sexual puede ser revertida con el tratamiento del hipotiroidismo. Estas observaciones contrastan con los efectos comunes del hipotiroidismo en mujeres adultas que generalmente se asocia a una falla de la ovulación.

Anomalías de la función testicular

Como en las mujeres, la disfunción gonadal masculina puede ser dividida en dos categorías: aquellas que resultan en disminución de la producción de andrógenos o hipogonadismo, y aquellas que resultan en la excesiva producción de andrógenos o hipergonadismo (Tabla 45-1). Ambas anomalías pueden ser atribuidas a una disfunción primaria de los testículos, o a un problema en el eje hipotalámico-hipofisiario y pueden resultar en infertilidad.

Hipogonadismo

El cuadro clínico del hipogonadismo está directamente relacionado con el momento en el cual se produce la deficiencia de andrógenos. Si la deficiencia de andrógenos se produce durante el segundo o tercer mes de desarrollo fetal puede resultar en ambigüedad sexual y pseudohermafroditismo. En el hipogonadismo pre-puberal, la ausencia de producción de andrógenos es asociada con la presencia de genitales infantiles, una próstata prácticamente no palpable, escaso desarrollo sexual secundario, ausencia de características sexuales secundarias normales y aspecto eunucoide. El hipogonadismo pre-puberal generalmente no se manifiesta hasta el período de la adolescencia cuando el desarrollo normal del adolescente incluyendo los cambios genitales y sexuales secundarios no ocurren.

El hipogonadismo post-puberal resulta en cambios mínimos. En los hombres jóvenes generalmente se observa disminución del crecimiento de la barba y del vello corporal que se vuelve mas fino. La próstata se atrofia y el deseo y la actividad sexual disminuyen. Los genitales pueden disminuir un poco de tamaño. En los hombres viejos el hipogonadismo puede pasar totalmente desapercibido.

Hipogonadismo primario. Debido a la ausencia de retrocontrol androgénico sobre el eje hipotalámico-hipofisiario, el hipogonadismo primario se manifiesta con el incremento de las gonadotropinas séricas y urinarias y la disminución de los niveles séricos de andrógenos y de los niveles urinarios de 17-cetosteroides (ver pág. 904). La anomalía testicular puede ser secundaria a una anormalidad del desarrollo, como pgor ejemplo un defecto genético o embriológico, o puede ocurrir en cualquier momento de la vida posterior. Las anormalidades del desarrollo son la causa mas frecuente de hipogonadismo pre-puberal.

La mayoría de los casos de hipogonadismo primario que se manifiestan después de la pubertad son el resultado de infecciones, trauma, irradiación, tumores que reemplazan el parénquima testicular o castración quirúrgica o accidental. Existen raras anomalías congénitas como la miotonía distrófica y la fibrosis quística que se pueden manifestar como hipogonadismo primario después de la pubertad.

Hipogonadismo secundario. El hipogonadismo secundario es el resultado de la falla hipofisiaria en producir LH y FSH. Esto es por lo general el resultado de un hipopituitarismo



primario y mas raramente puede deberse a una falla hipotalámica en liberar LHRH que a su vez resulta en la inadecuada síntesis de FSH y LH por la hipófisis.

En la mayoría de los casos de hipopituitarismo primario hay ausencia de todas las hormonas hipofisarias y por lo tanto una disminución de las funciones tiroidea, suprarrenal y gonadal a cualquier edad. Este *panhipopituitarismo* puede ser idiopático, congénito, o secundario a una lesión neurohipofisaria como una neoplasia, un quiste o un proceso granulomatoso. Cuando la pérdida progresiva de la función hipofisaria se debe a una lesión neurohipofisaria la disminución de las gonadotropinas es a veces la primera deficiencia que se observa y el paciente se presenta al inicio solamente con hipogonadismo.

La ausencia de gonadotropinas séricas y urinarias después de la adolescencia en pacientes con disminución de la función gonadal es diagnóstica de hipogonadismo secundario. El estudio de las hormonas del crecimiento, tiroideas, suprarrenales y antidiurética puede revelar una deficiencia clínicamente no sospechada de las otras hormonas hipofisarias.

Hipergonadismo

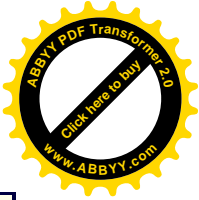
El hipergonadismo puede ocurrir como un proceso primario debido a la excesiva producción de andrógenos por un tumor testicular (carcinoma de células de Leydig o carcinoma de células intersticiales). El hipergonadismo también puede ocurrir como un proceso secundario a una alterada función del eje hipotalámico-hipofisario con aumento de la secreción de LH/FSH. El hipergonadismo primario se caracteriza por elevados niveles séricos de andrógenos, elevados niveles urinarios de 17-cetosteroides, y bajos niveles séricos de gonadotropinas. El hipergonadismo secundario en cambio se caracteriza por niveles séricos elevados de andrógenos y sus metabolitos urinarios a la vez que niveles elevados de gonadotropinas.

La producción excesiva de andrógenos en el hombre adulto casi no produce alteraciones morfológicas. A diferencia de ello en el niño se caracteriza por pubertad precoz. La pubertad precoz que ocurre en niños que no tienen historia familiar casi siempre está asociada con lesiones que ocupan espacio en la región del tercer ventrículo del cerebro.

La pubertad precoz masculina puede también ser el resultado de una excesiva producción de andrógenos suprarrenales. Las características de crecimiento y desarrollo en estos casos son idénticas a aquellas producidas por elevados esteroides testiculares: la diferencia es que en el caso de excesiva producción suprarrenal los testículos permanecen de tamaño pre-puberal.

Síndrome premenstrual (PMS)

El síndrome premenstrual (PMS) es comúnmente descrito como cambios del comportamiento asociados con el ciclo menstrual. El mismo se caracteriza como una serie de manifestaciones psicológicas y fisiológicas desencadenadas por cambios hormonales fisiológicos normales. Los síntomas mas frecuentes son inflamación abdominal, ansiedad, tensión en las mamas, crisis de llanto, depresión, cansancio, irritabilidad, sed y cambios del apetito. Todos estos síntomas se presentan los últimos 7 a 10 días del ciclo menstrual. No se conoce bien la causa del síndrome premenstrual y parece que no se debe a una causa única. Los tratamientos son varios e incluyen anticonceptivos orales, vitamina B₆, bromocriptina y



progesterona sintética. El médico debe tener en cuenta los síntomas específicos que cada paciente presenta para poder usar el tratamiento que considere mas efectivo en ese caso.

Dismenorrea

La dismenorrea es una condición caracterizada por dolor y calambres que afecta a mas o menos la mitad de las mujeres que menstrúan y se asocia con ciclos ovulatorios. La dismenorrea primaria es causada por contracciones miométriales inducidas por las prostaglandinas, especialmente prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) producida por el endometrio secretorio. Otros síntomas asociados pueden ser dolor de cabeza, náuseas, vómitos, dolor de espalda y diarrea. Las drogas que actúan como inhibidores de la prostaglandina sintetasa alivian efectivamente el dolor de la dismenorrea en alrededor del 80% de las mujeres con este problema. Estas drogas son el ibuprofeno, naproxeno, ácido flufenámico e indometacina. Otro beneficio de la inhibición de prostaglandinas es la reducción de la cantidad de sangre perdida con el flujo menstrual. En efecto, estas drogas muchas veces se usan para tratar casos de menorragia idiopática y excesiva producción de flujo menstrual asociado con la presencia de dispositivos intrauterinos (IUD).

Otros desórdenes que causan infertilidad

La infertilidad puede ser definida como la falla para concebir durante uno o mas años de actividad sexual sin protección. El 80% de las parejas que buscan un embarazo logran concebir en el plazo de un año manteniendo relaciones sexuales regulares. Un 10% adicional logrará concebir para el final del segundo año. El 10% restante permanecerá infértil después de dos años. Los problemas de fertilidad generalmente están relacionados con una de las siguientes áreas ya sea en el hombre como en la mujer: defectos en el eje hipotalámico-hipofisiario-gonadal, anomalías congénitas, defectos cromosómicos, infecciones, reacciones autoinmunes o disfunciones físicas.

Los factores femeninos generalmente contribuyen en un 40 a 50% en los problemas de infertilidad e incluyen problemas relacionados con la ovulación, anovulación (no ovulación) o oligo-ovulación (poca ovulación).

Anovulación es la incapacidad del ovario de producir óvulos. La función anormal del ovario puede deberse a un desorden primario en el ovario o un desorden en los mecanismos de control. La falla ovárica ocasionalmente ocurre en mujeres de menos de 35 años de edad después de la maduración sexual espontánea. En algunas pacientes, se asocia con autoanticuerpos contra el ovario que probablemente llevan a la destrucción autoinmune de este órgano. En otras pacientes, los ovarios tienen muy pocos folículos primordiales, a tal punto que se parecen a los ovarios de la menopausia. La presencia de excesiva cantidad de andrógenos es asociada con oligomenorrea o amenorrea. La evaluación de los niveles de FSH, LH y estrógenos en cada paciente puede ayudar a diagnosticar la causa de la anovulación. La infertilidad femenina puede también ser el resultado de defectos de la fase luteínica.

Defectos de la fase luteínica se caracterizan por una función anormal del cuerpo lúteo del ovario con producción insuficiente de progesterona. La producción insuficiente de progesterona no permite la implantación (infertilidad) o puede también interferir con el

mantenimiento del embrión en sus primeras etapas de desarrollo (aborto espontáneo). A menos que la GCH sea producida por el trofoblasto para continuar la estimulación, el cuerpo lúteo degenera, el nivel de progesterona cae y la menstruación ocurre. En pacientes con defectos en la fase luteínica, la cantidad y duración de la secreción de progesterona puede ser insuficiente, mientras que la producción de estrógenos por lo general permanece normal. Los defectos de la fase luteínica pueden ser clasificados realizando un análisis de los niveles séricos de progesterona específicamente 7 días después de la ovulación, una biopsia endometrial 5 días mas tarde y tal vez un examen ecográfico de los ovarios.

Otras causas de infertilidad femenina son obstrucción parcial de las trompas y presencia de anticuerpos contra los espermatozoides. La obstrucción tubárica puede deberse a cicatrices fibrosas secundarias a enfermedad inflamatoria pélvica; aproximadamente el 20% de los casos de infertilidad femenina se debe a factores tubáricos.

La infertilidad masculina ocurre en el 40 a 50% de las parejas. Un 10 a 20 % de los casos de infertilidad se debe a problemas en ambos miembros de la pareja.

Anomalías de la diferenciación sexual

Las características que se usan para determinar el sexo de una persona son siete en total: (1) cromosomas sexuales, (2) aspecto histológico de las gónadas, (3) morfología de los genitales externos, (4) morfología de los genitales internos, (6) sexo con el que antes de criado, y (7) sexo psicológico. El sexo cromosómico determinará el tipo de gónadas que se desarrollarán en el embrión. La diferenciación comienza durante la cuarta a sexta semana de gestación. El desarrollo testicular esta dirigido por genes en el cromosoma Y e incluyen el factor determinante de los testículos (TDF) y los genes de los antígenos HY. El desarrollo de los ovarios ocurre en la ausencia del cromosoma Y. El cromosoma X aparentemente es importante en el mantenimiento del ovocito. Se han identificado varias eliminaciones en el cromosoma X que son causa de anomalías ováricas y de la menstruación.

Se habla de ambigüedad sexual cuando la clasificación de mas arriba no logra describir con claridad el sexo de un individuo. Por ejemplo las gónadas son masculinas pero las otras características morfogenéticas sexuales son mixtas, se habla entonces de un pseudohermafrodita masculino. Una cosa similar puede suceder en caso de una persona con genitales femeninos.

Existen dos causas básicas para los desórdenes fisiológicos de ambigüedad sexual: (1) defectos en el desarrollo gonadal debido a una aberración cromosómica y (2) anomalías en el desarrollo debido a un defecto hereditario a pesar de la presencia de cromosomas normales. Los defectos cromosómicos que causan un desarrollo gonadal anormal pueden ser atribuidos a errores en la meiosis o en la mitosis. Ellos ocurren a caso y no son hereditarios ni ocurren mas frecuentemente entre hermanos. La mujer normal tiene 44 autosomas y dos cromosomas sexuales X, mientras que el varón normal tiene 44 autosomas, un cromosoma sexual X y un cromosoma sexual Y. Varios errores de la división meiótica pueden causar euploidia, un número anormal de cromosomas sexuales (ya sean extras o ausentes) a la vez que anomalías estructurales de los cromosomas sexuales. Cuando un óvulo con un cromosoma sexual extra o ausente es fertilizado por un espermatozoide normal varias formas de anomalías sexuales ocurren como por ejemplo el síndrome de Klinefelter (47, XXY) o el síndrome de Turner (45, X).

El síndrome de Klinefelter es un desorden muy común (1 en 4.000 nacimientos de

varones) y se caracteriza por testículos pequeños, ginecomastia, azoospermia e infertilidad. Es un desorden de intersexualidad ya que tiene características cromatínicas femeninas con morfología sexual completamente masculina.

El síndrome de Turner es también bastante común (1 en 7.000 nacimientos de mujeres) y se caracteriza por estatura baja, cuello corto y grueso y malformaciones cardíacas. Estas pacientes tienen genitales internos y externos inmaduros y ausencia de desarrollo sexual.

El verdadero hermafroditismo ocurre cuando ambos tejidos gonadales, masculino y femenino están presentes en una persona. El útero está casi siempre presente y en la época de la pubertad casi todos los hermafroditas desarrollan las mamas y menstrúan. El cariotipo más frecuente es 46, XX.

El diagnóstico de las anomalías de la diferenciación sexual es mejor realizado después del nacimiento. La identificación sexual temprana es importante tanto para el niño como para los padres. La asignación del sexo se basa en el aspecto de los genitales externos y la apariencia ecográfica de los órganos internos (útero y cervix). El cariotipo es utilizado solamente para confirmar estos hallazgos.

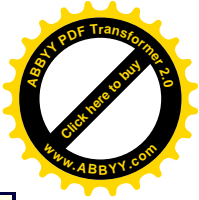
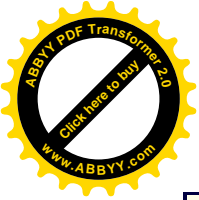
Amenorrea

Anomalías bioquímicas con exceso de andrógenos.

El exceso de andrógenos (hormona masculina) en la mujer generalmente produce desórdenes menstruales, incluyendo amenorrea. Los andrógenos más importantes en las mujeres son testosterona, dihidrotestosterona, DHEA y sulfato de DHEA. La testosterona libre es la forma bioactiva de la testosterona. Los andrógenos pueden derivar de fuentes ováricas o adrenales. La testosterona deriva de ambos, ovario y glándula suprarrenal, mientras que la DHEA y su sulfato derivan de la glándula suprarrenal solamente.

Las causas más comunes de exceso de andrógenos están enumeradas en la Tabla 45-2. Uno de los síntomas más frecuentes del exceso de andrógenos en la mujer es el hirsutismo. *Hirsutismo* es definido como un aumento anormal del vello corporal en la mujer. A pesar de que aproximadamente el 5% de las mujeres tienen hirsutismo, solamente el 40 al 60% de estas mujeres tendrán niveles elevados de andrógenos en el suero. Más de 95% de las mujeres con hirsutismo tendrán condiciones benignas como hirsutismo idiopático (la causa más común) o el síndrome de los ovarios poliquísticos. El resto de las mujeres deben ser investigadas para descartar la presencia de otras condiciones más graves como hiperplasia suprarrenal congénita, síndrome de Cushing (ver el capítulo 46) y tumores (benignos o malignos) de las glándulas suprarrenales o los ovarios.

Aproximadamente el 20% de las mujeres con exceso de andrógenos tienen ovarios poliquísticos. El síndrome del ovario poliquístico (PCO, Stein-Leventhal) se caracteriza por anovulación asociada con estimulación continua de los ovarios por niveles elevados de LH. Esto causa aumento de la producción ovárica de andrógenos, generalmente testosterona y androstenediona, así como cambios morfológicos característicos en los ovarios. Los niveles elevados de andrógenos producen amenorrea, hirsutismo, acné, y si no son corregidos, calvicie con características masculinas, hipertrofia del clítoris y cambios en la voz. Estos cambios indeseables son los que generalmente llevan a consultar a la paciente con hiperandrogenemia. Así como en los casos de hirsutismo, la mayoría de los casos de exceso de andrógenos en el síndrome de los ovarios poliquísticos son debidos a una falla ovárica más que a una disfunción



adrenal. Es necesario determinar la causa exacta con el fin de descartar la presencia de tumores ováricos o adrenales, síndrome de Cushing , y formas leves de hiperplasia suprarrenal congénita.

Hay diversas pruebas de laboratorio disponibles para evaluar a una paciente con hirsutismo en la que se sospecha un exceso de andrógenos, ver Figs. 45-6 y 45-7 y Tabla 45-3. La secreción de andrógenos por el ovario y la glándula suprarrenal puede ser evaluada inicialmente midiendo la testosterona (total, libre y débilmente unida), la androstenediona y el sulfato de DHEA. Si el sulfato de DHEA es normal se descarta la posibilidad de que el exceso de andrógenos sea de origen suprarrenal. Si las otras hormonas están elevadas, la paciente puede ser tratada con anticonceptivos orales combinados para suprimir la secreción hipofisiaria de LH y FSH. Si el exceso de andrógenos era dependiente de las gonadotropinas y de origen ovárico (como en el caso de el síndrome de los ovarios poliquísticos), los niveles séricos de andrógenos bajarán después de un mes de tratamiento con los anticonceptivos orales. Si los niveles de andrógenos no bajan con este tratamiento quiere decir que estos niveles excesivos son secundarios a una causa suprarrenal (ya sea tumor o defecto enzimático) o a un tumor ovárico. Si los niveles de DHEA son elevados, un test de supresión, utilizando dexametasona a dosis bajas por 5 días indicará si la producción de hormonas por la glándula suprarrenal puede ser suprimida o no. Esto permite diferenciar una hiperplasia adrenal o adenoma (supresión), de un tumor adrenal o un tumor hipofisiario (no hay supresión). Las mujeres con hiperplasia suprarrenal del adulto y deficiencia de la 21-hidroxilasa tendrán niveles elevados de 17- hidroxiprogesterona que son rápidamente suprimidos por la dexametasona.

Las mujeres con hirsutismo y niveles normales de testosterona total y androstenediona pueden ser evaluadas posteriormente midiendo la testosterona libre. Si los niveles de testosterona libre también son normales, la actividad de la 5 reductasa en los folículos pilosos puede ser estimada midiendo los niveles del androstenediol glucorónido. Si todos estos valores están dentro de límites normales podemos decir que la mujer tiene un hirsutismo idiopático.

Fertilidad e Infertilidad

Anomalías que causan infertilidad femenina

Hay muchas anomalías que causan infertilidad en la mujer como anomalías ováricas primarias, anomalías del sistema nervioso central, desórdenes de origen hipofisiario, exceso de andrógenos, y anomalías físicas (Tabla 45-4). Las bases bioquímicas y endocrinas de estos desórdenes han sido ya discutidas mas arriba. La evaluación de la infertilidad femenina esta incluida dentro de la evaluación por hirsutismo o amenorrea (Fig. 45-6 y 45-7).

Anomalías físicas.

Pacientes con aspecto normal y sexualmente maduras que consultan por amenorrea pueden tener anomalías en el tracto genital. En estas pacientes el sangrado no puede ser inducido ni después de tratarlas con progesterona o combinaciones de estrógeno con progesterona. La presencia o ausencia de ovulación puede ser evaluada mediante mediciones diarias de la temperatura basal corporal o midiendo los niveles séricos de progesterona una vez por semana por varias semana. Diversos defectos mullerianos, como por ejemplo himen



imperforado, anomalías en el cuello uterino, interrupciones del canal vaginal o ausencia de vagina, pueden ser causa de amenorrea. El sangrado menstrual se colecciona en el punto de la obstrucción, causando dolor, distensión y, a veces, acumulación de sangre en la cavidad peritoneal. La destrucción del endometrio por tuberculosis o un legrado muy agresivo también pueden ser causa de amenorrea.

Desórdenes que causan infertilidad masculina

Así como en la mujer, la infertilidad masculina puede estar causada por desórdenes en las gónadas mismas, la hipófisis o el hipotálamo. Estos desórdenes generales han sido ya discutidos mas arriba. Hay sin embargo muchas otras causas de infertilidad masculina como se puede ver en la Tabla 45-5. La infertilidad idiopática, en la cual la causa no puede ser identificada, es la mas común (aproximadamente 35%). Anomalías de los cromosomas sexuales, criptorquidismo, falla de los túbulos seminíferos del adulto y otras formas de falla testicular primaria son las causas identificables mas comunes (15% de los hombres infértiles). Factores físicos como una anomalía de los conductos, o problemas de eyaculación, como eyaculación retrógrada y ausencia de eyaculación, se ven en 10% de los casos, mientras que causas endocrinas se encuentran en aproximadamente 4% de los hombres que consultan por infertilidad. Una eyaculación pobre puede estar asociada con diabetes mellitus. Solamente una pequeña fracción de los casos de infertilidad se debe a causas autoinmunes. El abuso de alcohol y marihuana a largo plazo afecta adversamente la espermatogénesis.

La evaluación del hipogonadismo en el hombre adulto (Tabla 45-1) como posible causa de infertilidad incluye análisis del semen y mediciones de los niveles basales y de sobrecarga de testosterona, FSH y LH. Numerosas drogas pueden ser usadas para evaluar el nivel funcional hormonal y para elucidar la causa de la disfunción. La gondotrofina coriónica humana (GCH) es una hormona glicoproteica similar a la LH. Cuando es administrada estimula a las células de Leydig para producir testosterona permitiendo de esta manera el estudio de la función testicular. El citrato de clomifeno (Clomid) estimula la producción de GnRH y posteriormente LH y FSH. Clomid causaría un aumento de la testosterona y de las LH y FSH en el hombre normal sin patología hipofisiaria o hipotalámica. La GnRH puede ser usada para distinguir anomalías hipofisiarias de anomalías hipotalámicas midiendo los niveles de LH y FSH después de su administración. Estas pruebas de sobrecarga serán discutidas mas adelante.

Un esquema diagnostico útil para evaluar el hipogonadismo masculino se puede ver en la Fig. 45-8. Un paciente con falla gonadal primaria tendrá una muestra de semen escasa, testosterona baja o normal y niveles elevados de FSH y LH. Una falla gonadal secundaria se caracteriza por niveles bajos o inapropiados de FSH y LH y debe ser evaluada con pruebas funcionales que se describirán mas abajo. Oligospermia o azoospermia en presencia de niveles hormonales normales puede deberse a anomalías de los túbulos y conductos o espermatogénesis inadecuada.

La causa mas común de infertilidad masculina debida a una diferenciación sexual anormal es el síndrome de Klinefelter. Este se ve en aproximadamente el 0.2% de los hombres nacidos vivos y es debido a un cromosoma X extra. El paciente con genotipo XXY se caracteriza por pubertad retardada, hipogonadismo, ginecomastia, retraso intelectual, distocia, alteraciones en el comportamiento social e infertilidad. El fenotipo de estos pacientes varía



desde hombres obviamente feminizados hasta hombres viriles de aspecto normal con defectos físicos microscópicos y alteraciones bioquímicas menores. La falla de los túbulos seminíferos del adulto se ve en aproximadamente la mitad de los hombre infértiles. La falla en las células de Leydig del adulto con niveles bajos de testosterona es también conocida con el nombre de *síndrome del climaterio masculino* porque se parece a la menopausia femenina.

Para asegurar la fertilidad masculina, los espermatozoides deben contar con una cantidad adecuada de líquido seminal que contenga los nutrientes necesarios, deben tener aspecto y motilidad normales, capacidad para fertilizar y deben ser depositados cerca del cuello cervical femenino. Cualquier defecto en uno de estos factores puede resultar en infertilidad masculina.

Evaluación de la Pareja Infértil

La *Infertilidad* como se describió anteriormente, es la incapacidad de la una pareja para concebir después de un año manteniendo relaciones sexuales sin protección (Tabla 45-6). En el sentido médico infertilidad es la disminución en la capacidad para concebir comparando con la población general. *Fecundidad* es el porcentaje de concepciones que ocurren en una población dada en un período dado de tiempo, por ejemplo un mes. En una pareja con fertilidad normal, la fecundidad es aproximadamente del 20%. Entre las parejas infértiles, algunas son solamente *hipofértiles* y pueden concebir con tratamiento, mientras otras son *estériles* o sea completamente incapaces de concebir.

De acuerdo al Centro Nacional de Estadísticas de la Salud, en 1982 alrededor del 8.5% de las todas las parejas americanas con esposas entre 15 y 44 años eran infértiles. De estas, mas o menos el 40% no tenían hijas (infertilidad primaria) y el 60% tenía por lo menos un hijo (infertilidad secundaria). Entre 1965 y 1982 la incidencia de infertilidad primaria sufrió un aumento, esto probablemente debido al incremento en la incidencia de la enfermedad inflamatoria pélvica secundaria a infecciones genitales con neisseria gonorrea y clamidia.

La edad de la pareja tiene también su importancia en la fertilidad. La incidencia de infertilidad aumenta con el aumento de edad de la mujer. En los matrimonios tardíos aumenta la infertilidad desde un 9% en mujeres de 20 a 24 años a 15-30% a los 35, y 64% de los 40 a 44 años de edad. La probabilidad de concebir disminuye significativamente en las parejas que posponen el nacimiento de los hijos para mas adelante. La fecundidad es importante al evaluar las parejas infértiles. Si la fecundidad media de la población es 20%, se podría esperar que el 14% de las parejas no habrán concebido después de un año, el 4% después de 2 años, el 2% después de 3 años y el 1% después de 4 a 6 años. A pesar de que la infertilidad es definida como la incapacidad de concebir después de un año, deberá notarse que muchas parejas hipofértiles eventualmente concebirán después de este período sin ningún tratamiento. A menudo el tratamiento es usado para acelerar la concepción que de otra manera hubiese tardado mas en ocurrir normalmente. La evaluación de la pareja infértil incluye pruebas de laboratorio, exámenes físicos y tal vez algunos procedimientos diagnósticos invasivos (ver la discusión de pruebas funcionales, pág. 909). Todos los pacientes necesitan una historia clínica completa que incluya historia sexual y examen físico. Las pruebas de laboratorio iniciales son un hemograma y examen de orina en ambos, un Pap test y examen de glucosa en la mujer y un análisis de semen en el hombre. Exámenes de laboratorio adicionales se realizarán mas tarde a



medida que la evaluación continúa (véase la discusión previa sobre infertilidad e hipogonadismo).

Mediciones diarias de la temperatura basal corporal para documentar la ovulación se realizan de rutina. La ovulación generalmente ocurre 1 a 3 días después del nadir de la temperatura basal corporal. Se aconseja que la pareja tenga relaciones sexuales 3 días seguidos en la mitad del ciclo, comenzando el día antes de la ovulación. Un análisis de progesterona sérica 7 a 8 días después de la suba de la temperatura basal corporal confirmará si la ovulación ha ocurrido o no e indicará si hay niveles adecuados de progesterona para mantener la implantación.

El análisis del semen es uno de los medios objetivos mas importantes para evaluar la fertilidad masculina. El modo de recolección de la muestra es tan importante como el análisis mismo. Un volumen anormalmente bajo indica anomalías en la función secretora de las vesículas seminales. La ausencia de fructosa es sugestiva de una anomalía en el conducto eyaculador, mientras que la presencia de leucocitos o pus puede indicar la presencia de prostatitis. Oligospermia severa, motilidad baja, o morfología anormal de los espermatozoides pueden estar asociadas con enfermedad testicular, obstrucción parcial del conducto epididimario o un desorden endocrino. La azoospermia es sugestiva de una obstrucción completa del sistema eyaculatorio testicular. La presencia de anticuerpos contra los espermatozoides o constituyentes del líquido seminal pueden producir un espermatozoide no viable. En la *prueba de penetración de espermatozoides* ("SPA") se utilizan huevos de hámsteres para evaluar la capacidad de fertilización de los espermatozoides.

Cualquier anomalía encontrada en estas pruebas preliminares debe ser tratada. Por ejemplo, si la mujer tiene oligomenorrea y no ovula cada mes, la ovulación puede ser inducida con citrato de clomifeno antes de seguir realizando mas procedimientos diagnósticos. Con este tratamiento, aumenta la incidencia de embarazos múltiples. Si los resultados son normales en todos estos procedimientos diagnósticos preliminares, la mujer deberá someterse a una histerosalpingografía y/o laparoscopia durante la fase folicular de su ciclo menstrual. Si estas pruebas también resultan normales, existen algunas pruebas adicionales que se pueden realizar para evaluar la causa de infertilidad como por ejemplo pruebas inmunológicas, cultivos del moco cervical y del semen, mediciones de la hormona estimulante de la tiroides (para descartar hipotiroidismo) y de la prolactina (para descartar hiperprolactinemia), biopsia endometrial durante la fase luteínica y la prueba de penetración con los huevos de hámster.

Las parejas deben ser aconsejadas de acuerdo a cada caso en particular. Las mejores probabilidades de concebir tienen aquellas parejas en la que la única anomalía es la anovulación. La mitad de las parejas con infertilidad inexplicable generalmente conciben en el transcurso de un año después de completar la evaluación de infertilidad. En estos casos un tratamiento agresivo para la infertilidad solamente aceleraría la concepción que de todas maneras hubiese ocurrido.

Inducción de la ovulación

El *citrato de clomifeno* (*Clomid*) y la hormona liberadora de gonadotropinas (*GnRH*, *Factrel*) pueden ser administradas para inducir la ovulación por mecanismos ya discutidos. El Clomid es administrado por 5 días en dosis de 50 mg. Si no ocurre ovulación la dosis puede aumentarse a 100 mg por 5 días. Aproximadamente el 80% de las pacientes anovulatorias



responden a este tratamiento, y mas o menos la mitad quedan embarazadas. Hay un aumento de embarazos múltiples durante el tratamiento con Clomid. La GnRH se usa en pacientes con amenorrea secundaria a una disfunción hipotalámica asociada con una disminución de la secreción endógena de GnRH. En estos casos, la GnRH en dosis pulsátiles de 1 a 10 µg por pulso a intervalos de 60 a 120 minutos, puede inducir la ovulación.

La *gonadotropina menopáusica humana (Pergonal)*, usada con GCH, puede estimular la ovulación en pacientes anovulatorias que tienen tejido ovárico potencialmente funcional. Por varias razones, este tratamiento es usado solamente después de que el tratamiento con Clomid haya fallado. La administración de Pergonal es potencialmente peligrosa, complicada y costosa. Además hay un aumento de embarazos múltiples y abortos con Pergonal. Generalmente una o mas ampollas de Pergonal (cada una de 75 unidades de FSH y LH) son inyectadas intramuscularmente por día hasta que la producción de estrógenos sea óptima (600 a 1.000 pg/mL). En ese momento se inyectan intramuscularmente 5.000 a 10.000 unidades de GCH para inducir la ovulación del folículo maduro y después varias veces mas para ayudar a mantener la función del cuerpo lúteo.

La *bromocriptina* es usada ocasionalmente para inducir la ovulación en pacientes que tienen excesivos niveles séricos de prolactina con o sin galactorrea. Esta suprime la secreción de prolactina permitiendo que ocurran ciclos normales.

Reproducción inducida

Diversas técnicas de reproducción asistida pueden ser usadas en el tratamiento de parejas con historia larga de infertilidad inexplicable. Estas incluyen *fertilización in vitro y transferencia de embrión ("FIV")*, *transferencia del gameto dentro de la trompa de Falopio ("TGIT")* y *transferencia del cigoto dentro de la trompa de Falopio ("TCIT")*. La fertilización in vitro antes de realizada por primera vez en 1978 y consiste en la estimulación de los folículos con mucho control, el recobro de los óvulos, la manutención de lo gametos, y la transferencia del o los embriones dentro del tracto genital femenino. Para la inducción de la maduración folicular múltiple se usa el citrato de clomifeno o las gonadotropinas menopáusicas, la GCH se usa como un estímulo pre ovulatorio. La transferencia del gameto dentro de la trompa es un procedimiento similar, excepto que en este caso el óvulo es depositado dentro de la trompa junto con espermatozoides frescos, y en este caso la concepción ocurre "normalmente". En la transferencia del cigoto dentro de la trompa, la concepción ocurre in vitro, y después de 24 horas el cigoto es transferido a la trompa de Falopio. Con estos procedimientos, las fecundidades se acercan a lo normal, pero son métodos invasivos, costosos, prolongados y molestos.

Anticoncepción Mediante Intervención Endocrina

Los anticonceptivos orales están en el mercado de los Estados Unidos desde 1960. Ellos son el método anticonceptivo reversible mas usado porque son efectivos, baratos y fáciles de usar. La cantidad de estrógenos y progesterona presente en los anticonceptivos orales ha disminuido durante todos estos años y de este modo han disminuido también los efectos colaterales. La fórmula combinada consiste en píldoras que contienen estrógenos y



progesterona sintéticos que se toman continuamente durante 3 semanas y se dejan de tomar durante la cuarta semana. Estas hormonas inhiben los picos de FSH y LH que normalmente ocurren a mitad del ciclo, previniendo de este modo la ovulación. Ellas interfieren con liberación de GnRH por el hipotálamo. También poseen otros efectos fisiológicos que afectan la fertilidad.

Pequeñas dosis de progesterona administradas oralmente pueden también ser usadas para la anticoncepción. Ellas son particularmente útiles en aquellas pacientes que no pueden recibir. A pesar de producir sangrados anormales en muchos casos, ellas son igual de efectivas que los dispositivos intrauterinos en la prevención del embarazo. El embarazo puede ser evitado después del coito, con la administración de estrógenos solos o en combinación con progesterona.

Un agente antiprogestínico sintético, mifepristone, comúnmente llamado RU-486, ha recibido mucha atención por su capacidad de inducir la menstruación en mujeres incluso después que la fertilización ha ocurrido y está siendo evaluado por su posible uso anticonceptivo como “la píldora del día siguiente” capaz de terminar con embarazos muy precoces.

Pruebas Funcionales

Las gónadas son parte de un complejo sistema que incluye el hipotálamo, la hipófisis y los tejidos blanco. A veces se necesitan pruebas dinámicas para poder evaluar el funcionamiento de un miembro particular de esta compleja red. Mediciones de la FSH, LH, prolactina y estradiol en la mujer, y testosterona en el hombre, antes y después de estimulación o supresión puede ser una forma muy valiosa de establecer el diagnóstico en algunos desórdenes hormonales. Las siguientes son algunas pruebas de función gonadal.

Pruebas dinámicas en el hombre

La Gonadotropina coriónica humana (GCH) es una hormona con acción biológica similar a la LH. La función de las células de Leydig puede ser evaluada inyectando intramuscularmente 4000 UI de GCH por 4 días. En un paciente normal las células de Leydig al ser estimuladas sintetizan y secretan esteroides testiculares; el nivel sérico de testosterona aumenta al doble después de la cuarta inyección. Pacientes con anomalías gonadales primarias tendrán una respuesta disminuida, mientras pacientes con falla gonadal secundaria a anomalías hipotalámicas o hipofisarias tendrán una respuesta cualitativamente normal.

Citrato de clomifeno (Clomid) es un compuesto no esteroide con débil actividad antiestrogénica. Actúa incrementando la liberación de GnRH por el hipotálamo, esto lleva a la hipófisis a producir LH y FSH y a las células de Leydig a producir testosterona. La prueba se realiza con la administración de 100mg de citrato de clomifeno oralmente dos veces por día por 10 días. Se toman muestras antes de la administración de la droga así como después de los días 9 y 10. Los pacientes normales mostrarán un aumento del 50% al 250% en LH, del 30% al 200% en FSH y del 30% al 220% en testosterona para el día 10. Los pacientes con enfermedad primaria no responden aumentando la testosterona y aquellos con enfermedad secundaria o terciaria tendrán una respuesta anormal con las gonadotropinas.

GnRH (Gonadorelin) estimula directamente la producción hipofisaria de FSH y LH y



puede ser usada para evaluar la función gonadotrófica hipofisiaria. Se administran 100 µg de GnRH por vía intravenosa en bolo y se va sacando sangre a intervalos, desde el comienzo de la prueba durante 180 minutos. Los hombres normales aumentarán dos a cinco veces los valores basales de LH y dos veces los valores basales de FSH. Los pacientes con enfermedad testicular primaria pueden tener respuestas exageradas, mientras que aquellos con disfunción hipofisiaria no mostrarán ningún incremento en estos valores.

Pruebas físicas masculinas

Análisis del semen se realiza para evaluar la densidad, motilidad y morfología del espermatozoide.

La *prueba de penetración del espermatozoide* es una prueba funcional que mide la habilidad de los espermatozoides para penetrar (fertilizar) los óvulos. En esta prueba generalmente se utilizan ovocitos de hámster a los cuales se les ha removido las capas mas externas que normalmente evitan la fertilización entre especies diferentes. Cada óvulo es incubado con el espermatozoide y de esta manera se evalúa la habilidad de penetración de los espermatozoides. Esta prueba es controversial por ser realizada en condiciones artificiales y porque el producto formado es no viable. Se piensa que puede ser útil en parejas que desean tener una fertilización in vitro.

La *prueba de los anticuerpos contra los espermatozoides* mide los anticuerpos contra los espermatozoides. Estos anticuerpos pueden estar presentes en el hombre, en cuyo caso serian auto-anticuerpos y estarían presentes en el líquido seminal o en el suero. También pueden encontrarse anticuerpos contra los espermatozoides en el moco cervical o suero de la mujer. En cualquier caso estos anticuerpos interfieren con la fertilización por varios mecanismos diferentes. Si el anticuerpo está dirigido contra la cola de los espermatozoides, la motilidad estará afectada. Los anticuerpos que se dirigen contra la cabeza de los espermatozoides afectarán la capacidad de los mismos de unirse al óvulo. La mayoría de los procedimientos corrientes consisten en incubar una muestra de espermatozoide con el fluido de interés, seguido de la separación por medio de glóbulos cubiertos con anti-inmunoglobulinas y examen al microscopio.

Pruebas dinámicas femeninas

La *prueba de la GnRH* puede ser usada en mujeres para evaluar la respuesta hipofisiaria y su capacidad para producir FSH y LH. Se administran 100µg en bolo y se va sacando sangre a intervalos durante 180 minutos. En una paciente sana habrá un incremento del doble tanto de la FSH como de la LH dentro de los primeros 30 a 45 minutos después de la inyección. Una respuesta reducida o anormal a la GnRH indica hipofunción hipofisiaria. La prueba con el citrato de clomifeno puede entonces realizarse para confirmar la presencia de una anomalía hipotalámica.

El *citrato de clomifeno* normalmente estimula la liberación de GnRH por el hipotálamo, lo cual resulta en un aumento de la secreción de FSH y LH. En esta prueba se administran a la paciente 50 a 100 mg de citrato de clomifeno por 5 días (días 2 a 6 de su ciclo menstrual). En una paciente normal los valores de LH aumentarán al doble en los 10 días siguientes. Una respuesta disminuida indica hipofunción hipotalámica.

La *prueba de supresión con dexametasona* de los andrógenos suprarrenales puede ser usada para evaluar la causa de hirsutismo. En la prueba corta de supresión se utiliza 1 mg de dexametasona durante la noche, mientras en los protocolos mas largos se utilizan 0.5 mg de dexametasona durante 2 a 14 días. Esta prueba ayuda a diferenciar el síndrome de Cushing de un tumor adrenal (ver la discusión anterior).

La *prueba de la retirada de progesterona* es usada como una medida indirecta de los niveles endógenos de estradiol. El principio de esta prueba es que el sangrado uterino ocurrirá después del tratamiento con progesterona solamente si ha habido una previa estimulación del endometrio con estrógenos. En esta prueba se administra progesterona por vía oral diariamente por 5 días, después de los cuales el sangrado uterino debe ocurrir.

Pruebas físicas femeninas

La *exposición tubárica* debe evaluarse siempre que haya una historia de inflamación o cirugía pélvica. Con este fin pueden realizarse una histerosalpingografía o una laparoscopia con las cuales podrá detectarse la presencia y evaluar la extensión de cualquier anomalía pélvica.

Los *factores cervicales* son causa de infertilidad en aproximadamente el 5% de los casos creando un ambiente hostil para la concepción. El moco cervical puede evaluarse por medio del estiramiento (“*Spinnbarkeit*”), la apariencia en la lámina después de secarse (“aspecto de helecho”), el espesor, la translucidez y la presencia de espermatozoides vivos después de una relación sexual.

Cambio del Compuesto Analizado en la Enfermedad (Tabla 45-7)

Gonadotropinas (FSH y LH)

La medición de los niveles séricos de FSH y LH permiten evaluar la función del eje hipotalámico-hipofisiario y ayuda a distinguir una disfunción gonadal primaria de una secundaria. Debido a los cambios pulsátiles y cíclicos que ocurren durante todo el ciclo menstrual, se obtienen 2 a 3 muestras de sangre separadas por algunos minutos durante la fase folicular en la mujer. Estas muestras de sangre mezcladas dará una estimación mas exacta del nivel hormonal.

Un incremento de los niveles de FSH y LH se ve en los casos de falla gonadal primaria como por ejemplo el síndrome de Turner y la menopausia en la mujer, y el síndrome de Klinefelter y el criptorquismo en el hombre (ver la Tabla 45-1). En el síndrome de los ovarios poliquísticos, los niveles de LH pueden estar elevados, con niveles normales o bajos de FSH. Un ratio de LH/FSH mayor de 2:1 apoyaría el diagnóstico de esta patología.

Los niveles disminuidos de FSH y LH son significativos en presencia de niveles bajos de hormonas sexuales ya que en este caso indicarían un defecto del eje hipotalámico-hipofisiario. Pruebas adicionales serían necesarias para determinar la causa de estos niveles bajos de gonadotropinas (ver la discusión previa).



Andrógenos

Los andrógenos (hormonas masculinas) significativos clínicamente son la testosterona, la androstenediona, el sulfato de DHEA y la dihidrotestosterona. Las alteraciones en el balance normal de los andrógenos puede llevar a la virilización en la mujer y feminización en el hombre.

Niveles elevados de andrógenos (>2.000 ng/L de testosterona total y >8.000 μ g/L de DHEA) se ven en mujeres con tumores virilizantes, mientras que niveles sólo levemente elevados se ven en el síndrome de los ovarios poliquísticos (ver Tabla 45-3 y Fig. 45-6). Los niveles elevados de andrógenos no son clínicamente significativos en el hombre pero pueden ser causa de pubertad precoz en los pacientes pre-puberales.

Niveles disminuidos de andrógenos se ven en hombres con hipofunción testicular y síndrome de Klinefelter. La causa de niveles bajos de andrógenos puede hallarse en cualquier punto del eje hipotalámico-hipofisario-gonadal. Generalmente los niveles bajos de andrógenos no son significativos en la mujer.

Estrógenos

Los estrógenos se encuentran en la circulación en forma de estrona, estradiol y estriol, uno u otro de los cuales puede ser mas significativo en diferentes condiciones. El estrógeno que generalmente se mide es el estradiol, ya que está presente en niveles mas elevados y es el biológicamente mas activo.

Los niveles elevados de estrógenos son el resultado de una hiperfunción ovárica en la mujer, ya sea por un tumor feminizante (pubertad pseudoprecoz) o por una alteración del eje hipotalámico-hipofisario. Niveles muy elevados se encuentran durante la inducción de la ovulación y durante el embarazo. Durante el embarazo el estrógeno mas importante el estriol (ver pág. 797). En el hombre, los niveles elevados de estradiol y estrona pueden reflejar no solamente un aumento en la aromatización y secreción por los testículos y glándulas suprarrenales sino también una actividad de aromatización alterada en otros órganos como se puede ver en enfermedades hepáticas. El aumento de los niveles de estrógenos en el hombre se manifiesta con ginecomastia.

Los niveles disminuidos de estrógenos son clínicamente significativos en la mujer en las cuales significa hipofunción ovárica. Los niveles bajos de estrógenos no son significativos en el hombre.

Progesterona

Los niveles de progesterona en la mujer varían durante todo el ciclo menstrual con los niveles mas altos durante la fase luteínica. Un nivel de progesterona de 4 a 10 ng/mL obtenido durante los días 4 a 10 después de la ovulación presume la presencia de luteinización. Un nivel de mas de 10 ng/mL es una evidencia excelente de ovulación.

Niveles elevados de progesterona se ven durante el embarazo y en la fase luteínica del ciclo menstrual.

Niveles disminuidos se pueden ver en casos de infertilidad y amenaza de aborto.

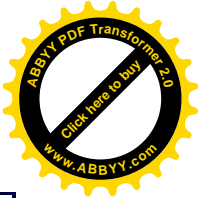
Agradecimientos



Con agradecimiento por los autores previos *Elizabeth J. Kicklighter y Robert J. Norman*
Traducción al español: *Elsa F. Velazquez, MD.*

Bibliografía

- Alsever RN: Hormone assays in endocrine systems. In Gold JJ, Josimovich JB, editors: *Gynecologic endocrinology*, New York, 1987, Plenum Medical Book Co.
- Andrews WC: Investigation of the infertile couple. In Gold JJ, Josimovich JB: *Gynecologic endocrinology*, New York, 1987, Plenum Medical Book Co.
- Bernstein GS, Siegel MS: *Male factor in infertility*. In Mishell D, Davajan V, Lobo RA, editors: *Infertility, contraception, and reproductive endocrinology*, Boston, 1991, Blackwell Scientific Publications.
- Braunstein GD: Testes. In Greenspan FS, editor: *Basic and clinical endocrinology*, Norwalk, Conn., 1991, Appleton & Lange.
- Gibbons WE, Battin DA, diZerega GS: Mechanism of action of reproductive hormones. In Mishell D, Davajan V, editors: *Infertility, contraception, and reproductive endocrinology*, Oradell, N.J., 1986, Medical Economics Books.
- Goebelsmann U: Steroid hormones. In Mishell D, Davajan V, editors: *Infertility, contraception, and reproductive endocrinology*, Oradell, N.J., 1986, Medical Economics Books.
- Goldfien A, Monroe SE: Ovaries. In Greenspan FS: *Basic and clinical endocrinology*, Norwalk, Conn., 1991, Appleton & Lange.
- Hylka VW, DiZerega GS: Reproductive hormones and their mechanism of action. In Mishell DR, Davajan V, Lobo RA, editors: *Infertility, contraception, and reproductive endocrinology*, Boston, 1991, Blackwell Scientific Publications.
- Lobo RA: The menstrual cycle. In Mishell DR, Davajan V, Lobo RA, editors: *Infertility, contraception, and reproductive endocrinology*, Boston, 1991, Blackwell Scientific Publications.
- Lobo RA, Kletzky OA: Dynamics of hormone testing. In Mishell DR, Davajan V, Lobo RA, editors: *Infertility, contraception, and reproductive endocrinology*, Boston, 1991, Blackwell Scientific Publications.
- Lipsett MG: Steroid hormones. In Yen SSC, Jaffe RB: *Reproductive endocrinology: physiology, pathophysiology, and clinical management*, Philadelphia, 1986, Saunders.
- March CM, Mishell DR: Induction of ovulation. In Mishell DR, Davajan V, Lobo RA, editors: *Infertility, contraception, and reproductive endocrinology*, Boston, 1991, Blackwell Scientific Publications.
- March CM, Shoupe D: Luteal-phase defects. In Mishell DR, Davajan V, Lobo RA, editors: *Infertility, contraception, and reproductive endocrinology*, Boston, 1991, Blackwell Scientific Publications.
- Mishell DR: Oral steroid contraceptives. In Mishell DR, Davajan V, Lobo RA, editors: *Infertility, contraception, and reproductive endocrinology*, Boston, 1991, Blackwell Scientific Publications.
- Mishell DR, Davajan V: Evaluation of the infertile couple. In Mishell DR, Davajan V, Lobo RA, editors: *Infertility, contraception, and reproductive endocrinology*, Boston, 1991, Blackwell Scientific Publications.
- Mishell DR, Lobo RA: Disorders of sexual differentiation. In Mishell DR, Davajan V, Lobo RA, editors: *Infertility, contraception, and reproductive endocrinology*, Boston, 1991, Blackwell Scientific Publications.
- Mooradian AP, Morley JE, Korenman, SG: Biological action of androgens, *Endocr Rev* 8:1, 1987.
- Ross GT, Schreiber JR: The ovary. In Yen SSC, Jaffe RB: *Reproductive endocrinology: physiology, pathophysiology, and clinical management*, Philadelphia, 1986, Saunders.



Speroff L, Glass RH, Kase NG: The ovary from conception to senescence. In *Clinical gynecologic endocrinology and infertility*, Baltimore, 1989, Williams & Wilkins.

Steinberger E: Male infertility. In Gold JJ, Josimovich JB: *Gynecologic endocrinology*, New York, 1987, Plenum Medical Book Co.

Swerdloff RS: Infertility in the male, *Ann Intern Med* 103:906, 1985.

Tablas

Tabla 45-1. Causas de hipogonadismo en el hombre.

Hipogonadismo primario

Síndrome de Klinefelter
Otros defectos cromosómicos (por ejemplo xy/xyy, xx/xyy etc)
Aplasia de las células de Leydig
Criptorquismo
Falla de las células de Leydig o de los túbulos seminíferos del adulto
Trauma testicular

Hipogonadismo secundario

Panhipopituitarismo
Deficiencia de LH
Deficiencia de LH y FSH

Defectos en la actividad androgénica

Insensibilidad completa a los andrógenos (feminización testicular)
Insensibilidad incompleta a los andrógenos (por ej. deficiencia de la 5 -reductasa)

Tabla 45-2. Causas de exceso de andrógenos en la mujer.

Causas ováricas

Síndrome de los ovarios poliquísticos
Hipertecosis
Tumores productores de andrógenos

Causas suprarrenales

Hiperplasia congénita del adulto
Tumores productores de andrógenos
Síndrome de Cushing

Obesidad

Post menopausia
Fármacos (fenitoína, danazol, minoxidil)



Idiopática o familiar

Tabla 45-3. Hallazgos de laboratorio en el hirsutismo.

Condición patológica	Alteración bioquímica		
	Testosterona total	Testosterona libre	DHEAS
Hirsutismo idiopático	↑	↑↑↑	↑
Síndrome de los ovarios poliquísticos	↑	↑↑	↑
Hiperplasia adrenal congénita	↑↑	↑↑	↑↑↑
Tumores virilizantes			
Ováricos	↑↑↑	↑↑↑	↑
Adrenales	↑↑	↑↑	↑↑↑
Modificado de Demers LM: <i>Hirsutism and Virilization, News and Views</i> , material producido por la Asociación Americana de Química Clínica, Washington, DC, Abril de 1989. DHEAS, Sulfato de dehidroepiandrosterona			

Tabla 45-4. Causas de infertilidad femenina.

Hipogonadismo primario
Hipogonadismo secundario (hipofisiario) y terciario (hipotalámico)
Hipergonadismo primario
Anomalías de la diferenciación sexual secundarias a anomalías genéticas
Amenorrea con exceso de andrógenos
 Defecto de la fase luteínica con insuficiente producción de progesterona
Desórdenes físicos
 Obstrucción de las trompas de falopio
 Anomalías del cuello cervical o la vagina

Tabla 45-5. Causas de infertilidad masculina.

Endocrinas
 Desórdenes hipotalámicos-hipofisiarios
 Desórdenes gonadales
 Defectos de la actividad androgénica
 Desórdenes de la tiroides
 Desórdenes de la suprarrenal
Defectos en la espermatogénesis

Enfermedades sistémicas y estado general de salud
Infecciones gonadales y urológicas (prostatitis, orquitis),
infecciones testiculares (parotiditis)
Obstrucción ductal
Varicocele
Eyaculación retrógrada
Anticuerpos contra los espermatozoides
Defectos anatómicos
Idiopática

Tabla 45-6. Causas de infertilidad.

Organo afectado	Resultado	Causa
Mujer		
Hipotálamo	Disminución de la hormona liberadora de gonadotropinas	Fármacos Estrés Dieta
Hipófisis	Disminución de la FSH y LH	Tumor destructivo
Ovarios	Disminución del estradiol o la progesterona	Falla ovárica Disgenesia ovárica Tumores Anticuerpos contra el ovario Malnutrición, bajo peso, alteraciones metabólicas
Trompas de falopio y útero	Endometrio inadecuado Cicatrices y obstrucción tubárica Disminución del moco cervical	Progesterónico baja Enfermedad inflamatoria pelviana Infecciones cervicales
Concepción	Inmovilización y destrucción de los espermatozoides	Anticuerpos contra el esperma
Hombre		
Hipotálamo y pituitaria	Azoospermia y oligospermia	Defectos primarios en el hipotálamo o la pituitaria Andrógenos exógenos Disfunción testicular con disminución de la producción testicular
Testículos	Azoospermia y oligospermia	Orquitis, infecciones testiculares (parotiditis)

		Alcoholismo y abuso de sustancias
	Maduración sexual retardada o deficiente; testosterona disminuida	Defectos cromosómicos
Próstata	Disminución del líquido seminal	Infecciones de la próstata o de las vesículas seminales
Tracto uretrogenital	Eyacuación retrógrada o ausente	Anomalías físicas; diabetes crónica

Tabla 45-7. Cambio del compuesto analizado en la enfermedad.

Enfermedad	FSH	LH	Compuesto analizado	
			Estradiol	Testosterona
Mujer				
Falla ovárica primaria (menopausia)		↑	↑	-
Falla ovárica secundaria	↓	↓	↓	-
Tumores feminizantes	↓	↓	↑	-
Tumores masculinizantes	↓	↓	-	↑
Tumores productores de gonadotropinas o gonadotropinas exógenas (raros)	↑	↑	↑	-
Síndrome del ovario poliquístico	No a ↓	↑	-	↑
Hombre				
Falla testicular primaria	↑	↑	-	↓
Falla testicular secundaria	↓	↓	-	↓
Hiperactividad testicular primaria (ej. debido a tumor, testotoxicosis)	↓	↓	-	↑
Hiperactividad testicular secundaria (ej. debido a pubertad precoz)	↑	↑	-	↑

Figuras

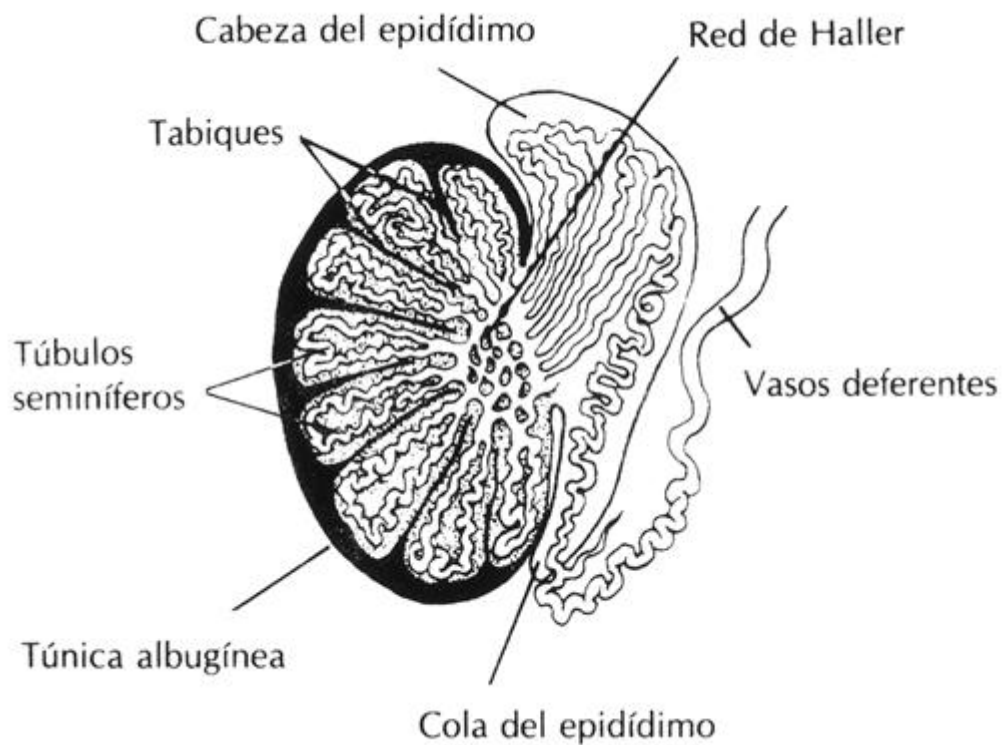


Figura 45-1 Anatomía de los testículos. (DE Ganong WF: *Review of medical physiology*, ed 2, Los Altos, Calif., 1983, Lange Medical Publications.)

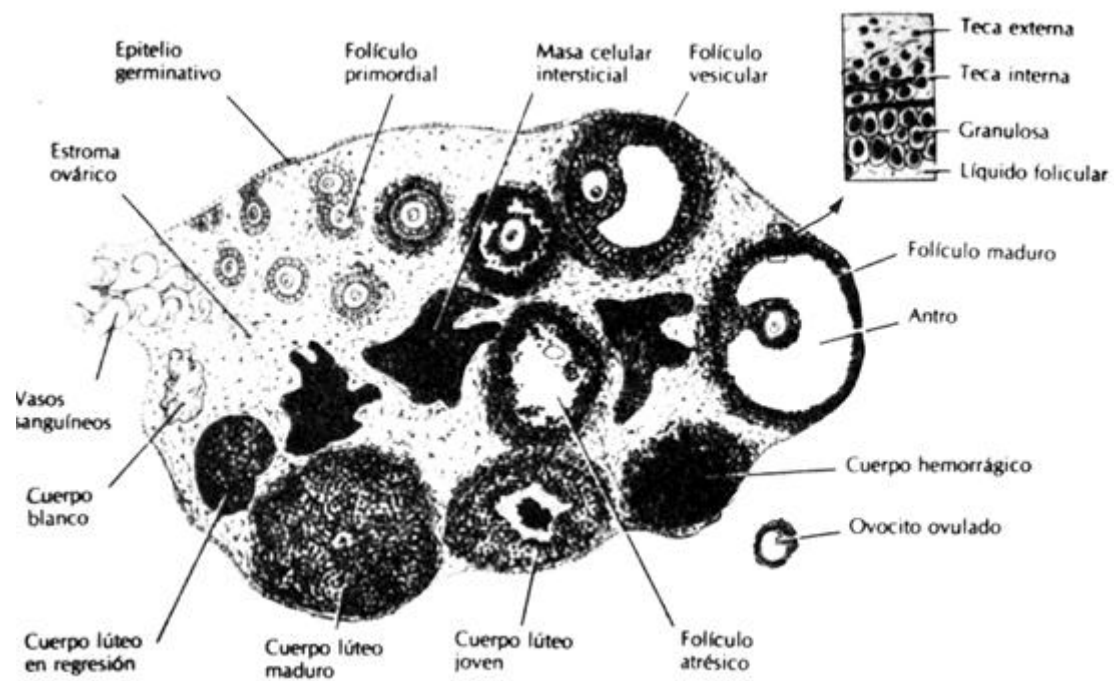


Figura 45-2 Diagrama del ovario donde se muestra el desarrollo secuencial de un folículo y la formación del cuerpo lúteo. Arriba a la derecha se puede observar aumentada a sección de la pared de un folículo. (De Gorbman A, Bern HA: *A textbook of comparative endocrinology*, New York, 1962, Wiley & Sons.)

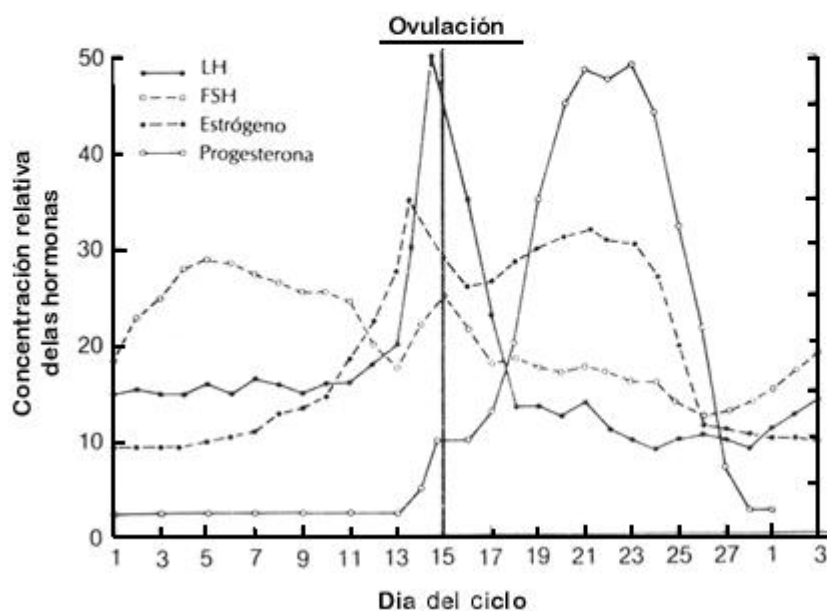


Figura 45-3 Cambios en niveles sanguíneos de varias hormonas durante el ciclo menstrual. (Modificado de Taymor ML, Berger MJ, Thompson IE, Karamo KS: *Am J Obstet Gynecol* 114:445, 1972.)

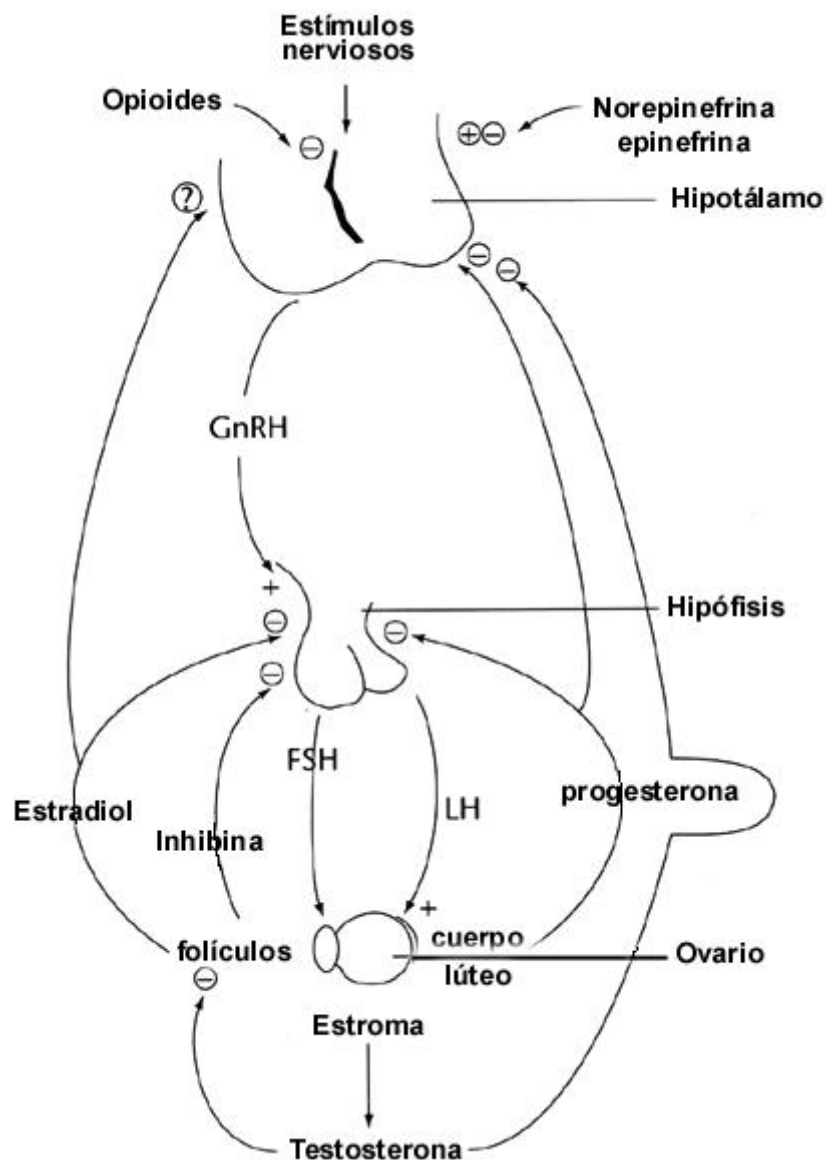


Figura 45-4 Diagrama del eje hipotalámico-pituitaria-ovárico. *FSH*, hormona folículo estimulante; *E2*, estradiol; *GnRH*, hormona liberadora de gonadotropina; *LH*, hormona luteinizante; +, positive effect; -, negative effect. (De Greenspan FS: *Basic and clinical endocrinology*, East Norwalk, Conn., 1991, Appleton & Lange.)

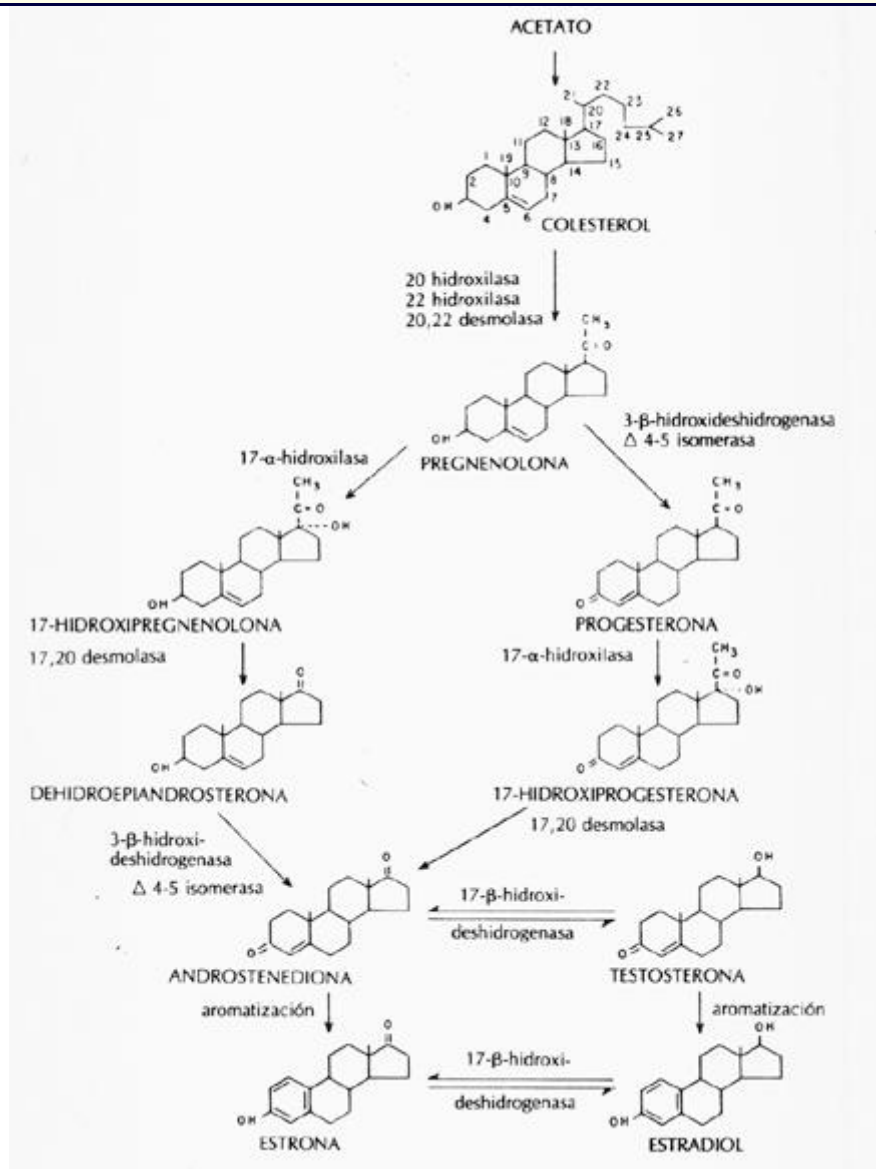
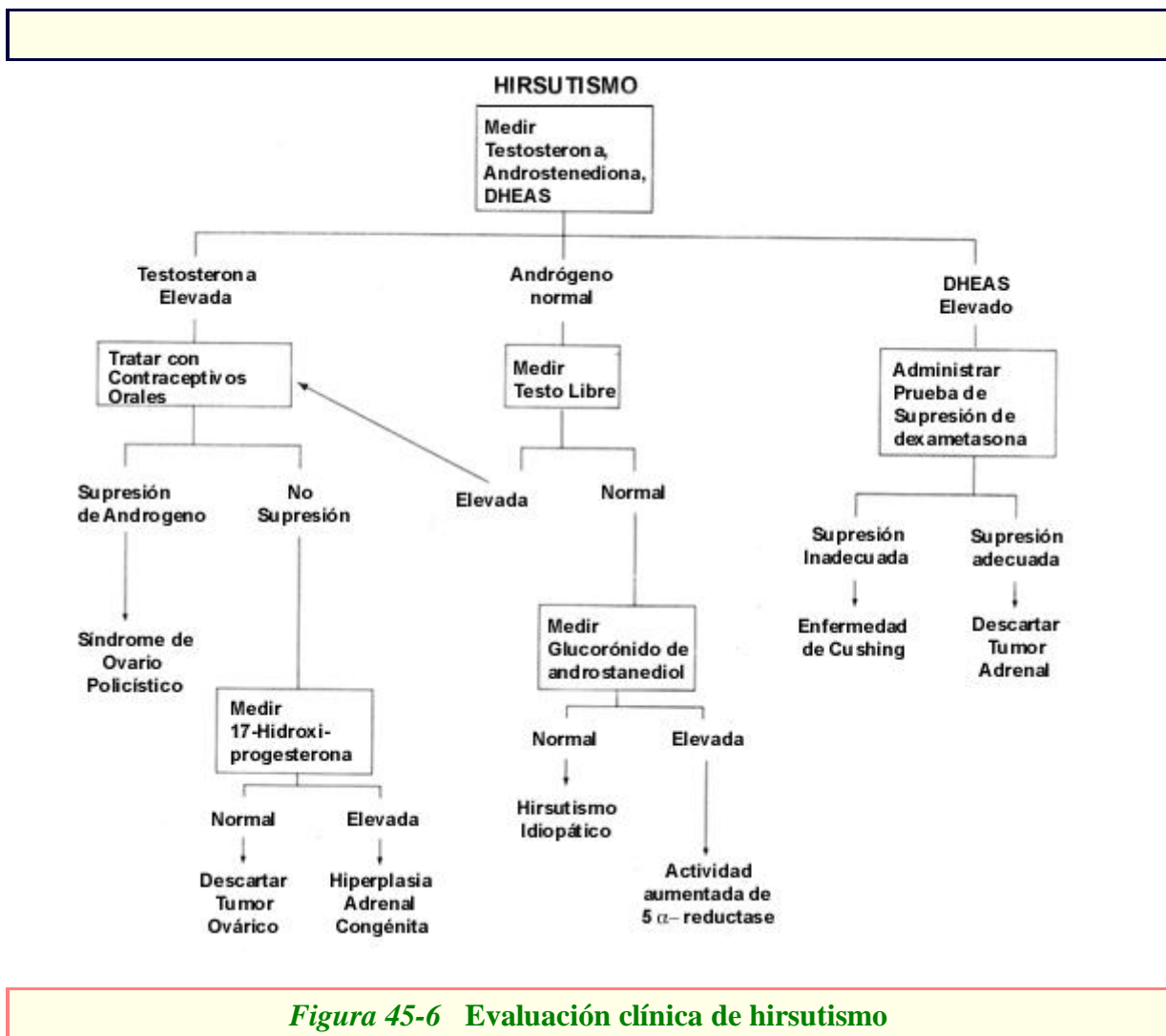


Figura 45-5 Vías de esterodogénesis sexual. Mayúsculas, productos metabólicos; minúsculas, enzimas de la vía metabólica. (De Felig P et al: *Endocrinology and metabolism*, New York, 1981, McGraw-Hill.)



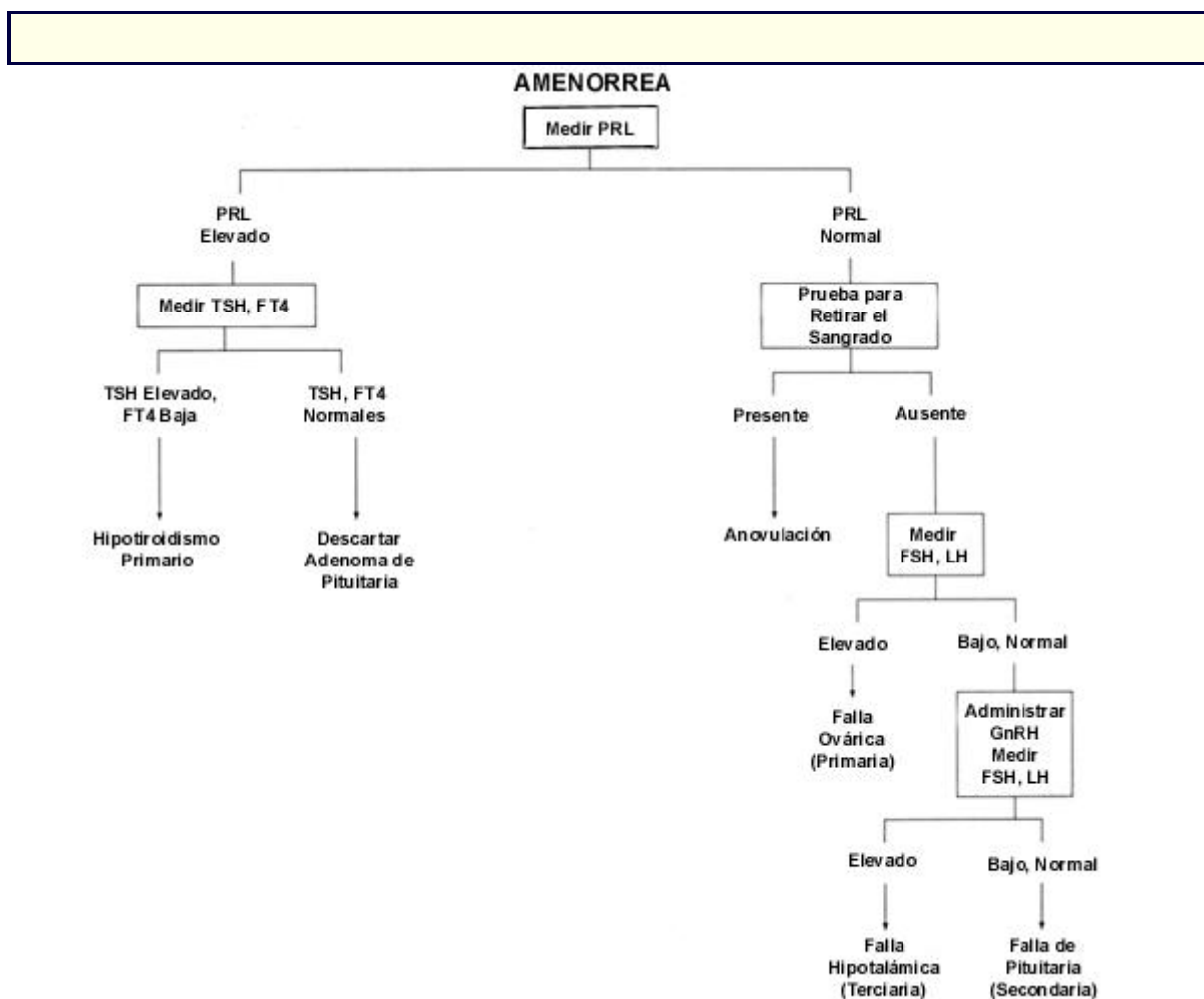


Figura 45-7 Evaluación del diagnóstico clínico de amenorrea. *PRL*, prolactina.

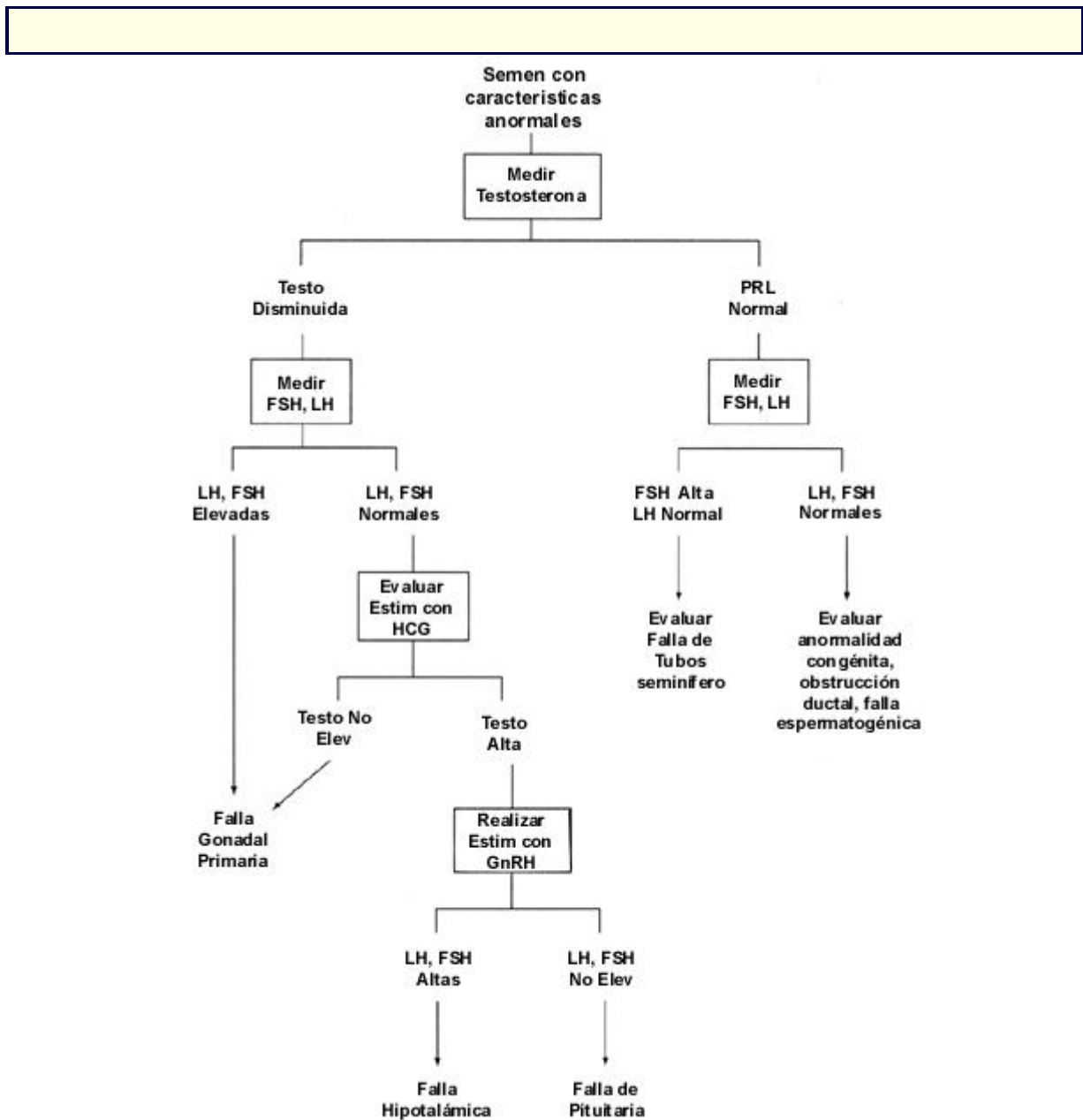


Figura 45-8 Evaluación del diagnóstico clínico de hipogonadismo masculino.

CAPÍTULO 46

46. Hormonas Adrenales e Hipertensión



Morris R. Pudek

Parte I: LAS HORMONAS ADRENALES

Anatomía

Fisiología de las hormonas adrenales

Glucocorticoides

Mineralocorticoides

Andrógenos adrenales

Catecolaminas

Biosíntesis

Adrenocorticosteroides

Catecolaminas

Transporte y catabolismo

Adrenocorticosteroides

Catecolaminas

Control y regulación

Glucocorticoides

Mineralocorticoides

Andrógenos adrenales

Catecolaminas

Condiciones patológicas

Desórdenes de la corteza adrenal

Hiperadrenalismo

Hipoadrenalismo

Desórdenes de la médula adrenal: feocromocitoma

Alteraciones de los compuestos analizados en la enfermedad

Hiperadrenalismo

**Hipoadrenalismo, o insuficiencia adrenal primaria
(enfermedad de Addison)**

Feocromocitoma

Parte II: HIPERTENSIÓN

Definición y criterios

Factores reguladores de la presión sanguínea normal

Condiciones patológicas

Hipertensión primaria

Hipertensión secundaria

Complicaciones de la hipertensión

Alteraciones de los compuestos analizados en la enfermedad

Estudios secundarios

Terapia con fármacos



OBJETIVOS:

- Enumerar los principales glucocorticoides, mineralocorticoides, andrógenos adrenales, y hormonas medulares y establecer sus efectos fisiológicos.
- Describir las síntesis, transporte, catabolismo, y regulación de los glucocorticoides, mineralocorticoides, andrógenos adrenales, y hormonas medulares.
- Describir cada una de las siguientes condiciones patológicas, incluyendo los resultados del laboratorio diagnóstico: síndrome de Cushing, hiperaldosteronismo, hiperplasia adrenal congénita, enfermedad de Addison, y feocromocitoma.
- Describir cada una de las siguientes pruebas de las funciones adrenales y la interpretación de los resultados: prueba de supresión de clonidina, pruebas de supresión durante la noche y de 2-días de dexametasona, prueba de estimulación de ACTH, prueba de estimulación de CRH y muestreo de seno petroso bilateral, prueba de supresión de captopril, y prueba de metirapona.
- Describir algunos de los factores reguladores de la presión sanguínea normal y enumerar las principales causas y complicaciones de la hipertensión.
- Describir la evaluación de laboratorio mínima para el trabajo inicial de un paciente con hipertensión y los indicadores para las pruebas de hipertensión secundaria.
- Enumerar algunas de las más importantes complicaciones metabólicas asociadas con la terapia antihipertensiva.

Términos clave

adrenocorticosteroides Se refiere a todos los esteroides secretados por la corteza adrenal.

adrenoleucodistrofia Desorden hereditario vinculado al cromosoma X en el metabolismo de los ácidos grasos de cadena larga que puede conducir a problemas neurológicos severos y a una insuficiencia adrenal primaria.

catecolaminas Epinefrina y norepinefrina, las cuales son producidas en la médula adrenal y son responsables de mantener la presión sanguínea.

células cromafines Estas células se encuentran en la médula adrenal y en otros sitios del organismo y producen catecolaminas.

corteza adrenal Porción externa de la glándula adrenal que produce varias hormonas esteroides.

enfermedad de Addison Insuficiencia adrenal primaria, comúnmente es el resultado de una adrenalitis autoinmune.

enfermedad de Cushing Una forma del Síndrome de Cushing específicamente atribuible a un adenoma hipofisiario liberador de ACTH.

feocromocitoma Tumor de las células cromafines, generalmente localizado en la médula adrenal, que conduce a una hipersecreción de epinefrina y norepinefrina.

globulina fijadora de corticosteroides También conocida como *transcortina*. Proteína que une y transporta la mayoría del cortisol en la circulación.

glucocorticoides Grupo de hormonas esteroidales secretadas por la corteza adrenal que tiene múltiples efectos fisiológicos incluyendo la regulación del metabolismo de carbohidratos. El cortisol es el principal glucocorticoide en el hombre.

hiperaldosteronismo Secreción aumentada de aldosterona de la corteza adrenal, debido a elevados niveles sanguíneos de renina o a una secreción adrenocortical autónoma



(síndrome de Conn).

hiperplasia adrenal congénita También conocida como *Síndrome adrenogenital*. Grupo de enfermedades hereditarias que ocurre como consecuencia de deficiencias enzimáticas en las vías de producción de hormonas esteroidales.

hipertensión primaria También llamada *hipertensión esencial*. Consiste en una elevada presión arterial sistémica para la cual no se ha podido encontrar la causa y que es a menudo el único hallazgo clínico significativo.

hipertensión secundaria Elevada presión sanguínea asociada con muchas enfermedades primarias, como enfermedad renal, endocrina, y vascular.

hipoadrenalismo Insuficiencia adrenal que provoca una disminución en la salida de hormonas esteroidales de la corteza adrenal.

hormona adrenocorticotrópica (ACTH) Hormona polipeptídica secretada por la glándula hipofisiaria anterior, que principalmente estimula la síntesis y liberación de glucocorticoides de la corteza adrenal.

hormona liberadora de corticotrofina (CRH) Polipéptido producido en el hipotálamo que estimula la secreción de ACTH.

médula adrenal Porción interna de ambas glándulas adrenales que produce catecolaminas.

mineralocorticoides Grupo de hormonas esteroides secretadas por la corteza adrenal que estimulan la reabsorción de sodio y la excreción de potasio en los túbulos distales de los riñones. La aldosterona es el principal mineralocorticoide en el hombre.

prueba de estimulación con ACTH Una prueba inicial de exploración usada en la evaluación de la insuficiencia adrenal.

prueba de la metirapona Prueba de la función adrenal que puede ser utilizada en la evaluación de la función hiperadrenal e hipoadrenal. La metirapona bloquea la actividad 11-hidroxilasa, y la respuesta es generalmente determinada por medición del 11-desoxicortisol en la sangre.

prueba de supresión con captopril Prueba útil en la investigación del síndrome de Conn. El Captopril es un inhibidor de la enzima convertidora de la angiotensina y bloquea la formación de angiotensina II, lo cual normalmente provoca una falta de aldosterona.

prueba de supresión con clonidina Prueba funcional usada para el diagnóstico de feocromocitoma.

prueba de supresión con dexametasona Prueba funcional utilizada en el diagnóstico y diferenciación de varias causas del síndrome de Cushing.

síndrome de Conn Otro término utilizado para designar el hiperaldosteronismo primario.

síndrome de Cushing Una gama de síntomas específicos resultado de la elevación de los niveles de glucocorticoides sanguíneos debido a causas primarias o secundarias.

sistema renina-angiotensina Este sistema es responsable de la regulación de la secreción de aldosterona en la corteza adrenal.

zona glomerular Porción exterior de la corteza adrenal en la que se producen los mineralocorticoides.

zona fascicular Porción media de la corteza adrenal en la que se producen glucocorticoides y varias hormonas sexuales.

zona reticular La porción más interna de la corteza adrenal, adyacente a la médula adrenal, que actúa coordinadamente con la zona fascicular.



Parte I: Las hormonas adrenales

Anatomía

Las glándulas adrenales están situadas sobre el polo superior de cada riñón (Fig. 46-1). La corteza adrenal adulta, que constituye el 90% del volumen de la glándula, consta de tres capas diferentes. La capa exterior se denomina la *zona glomerular*. La amplia capa media y la capa interior se llaman la *zona fascicular* y la *zona reticular* respectivamente. Estas tres capas secretan hormonas esteroidales que pueden tener funciones mineralocorticoides, glucocorticoides o andrógenicas. La glándula está altamente vascularizada con una circulación venosa compleja que se cree que tiene un papel en la regulación de la síntesis de hormonas esteroidales.

La médula adrenal consiste de laminados de células irregulares con pequeños núcleos llamadas *células cromafines*. Estas células sintetizan y secretan las catecolaminas.

Fisiología de las Hormonas Adrenales

Todos los esteroides adrenales secretados por la corteza adrenal (adrenocorticoesteroides) tienen el mismo núcleo básico ciclopentanoperhidrofenantreno que consiste en tres anillos hexanos de 6 carbonos y un anillo de 5 carbonos. La numeración de los átomos de carbono se indica en la Fig. 46-2. Las moléculas esteroidales con 21 átomos de carbono y un grupo hidroxilo en el carbono 17 son llamadas *17-hidroxiesteroides*. Las estructuras esteroidales con 19 átomos de carbono con un grupo cetona en el carbono 17 son llamadas *cetoesteroides*.

Hay tres grupos funcionales principales de los esteroides secretados por la corteza adrenal. Estos son los *mineralocorticoides*, secretados por la zona glomerular, y los *glucocorticoides* y *andrógenos* secretados por la zona reticular y la zona fascicular. Diferencias relativamente menores en la estructura química dan como resultado grandes diferencias en la función fisiológica de estas moléculas esteroidales.

La médula adrenal secreta las catecolaminas. Estas moléculas no están relacionadas en su estructura con los esteroides adrenales y tienen funciones fisiológicas muy diferentes.

Glucocorticoides

Los glucocorticoides (principalmente el cortisol en humanos), son sintetizados y secretados por la zona fascicular y la zona reticular. Estos esteroides están involucrados en la regulación del metabolismo de carbohidratos, proteínas, y lípidos. El cortisol en altas concentraciones también muestra actividad mineralocorticoide. Algunos de los efectos fisiológicos más importantes de los glucocorticoides se resumen en un cuadro más adelante. Estas hormonas son esenciales para la vida, especialmente cuando el cuerpo humano está sometido a situaciones de estrés como cirugía, enfermedad seria, o trauma severo. Las



concentraciones de cortisol aumentan mucho durante estas situaciones, con una salida de cortisol de las glándulas adrenales que aumenta de 25 mg/día a más de 300 mg/día. El estrés induce la liberación de numerosas sustancias mediadoras como las catecolaminas y las quininas que pueden afectar la función cardiovascular, y si no son vigiladas, pueden conducir a un colapso cardiovascular. Los glucocorticoides bloquean la producción y acción de los mediadores y previenen que estos propicien una condición fatal.

La acción metabólica global de los glucocorticoides es catabólica, promoviendo la ruptura de proteínas y lípidos, e inhibiendo la síntesis proteica en el músculo, tejido conectivo, tejido adiposo, y células linfoides. Se inhibe la cicatrización de heridas y se favorece la osteoporosis. Los glucocorticoides, sin embargo, tienen un efecto anabólico sobre el metabolismo hepático. Los efectos del cortisol son antagonistas a los de la insulina, aumentando la concentración de glucosa por estimulación de la gluconeogénesis. Los aminoácidos y el glicerol liberados por la acción catabólica del cortisol sobre las proteínas y las grasas son usados como sustratos para la gluconeogénesis. El cortisol aumenta la síntesis y actividad de numerosas enzimas en el hígado que están involucradas en el metabolismo de aminoácidos y glucosa. El efecto neto es un aumento en la producción y conservación de la glucosa para uso de los tejidos esenciales como el cerebro y los glóbulos rojos, a expensas de tejidos “menos esenciales” durante tiempos de estrés o inanición.

El cortisol también contribuye a mantener la presión sanguínea normal mediante mecanismos aún desconocidos. El cortisol aumenta el flujo urinario por estimulación de la velocidad de filtración glomerular y disminución de la reabsorción de agua. En altas concentraciones, sin embargo, el cortisol puede actuar como un mineralocorticoide promoviendo la retención de sodio y agua y provocando hipokalemia. El cortisol interactúa ávidamente con los receptores de los mineralocorticoides. De hecho, los niveles de cortisol libre en el suero son 150 veces mayores que los niveles de aldosterona libre; por lo tanto los receptores de mineralocorticoides están saturados con cortisol en la mayoría de los tejidos excepto en los riñones. Las células renales rápidamente convierten el cortisol en cortisona, permitiendo que la aldosterona sea el regulador predominante de la reabsorción de sodio y excreción de potasio.

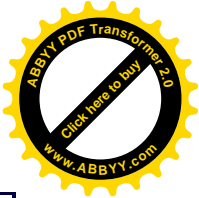
Los efectos hematológicos del cortisol son múltiples, estimula la eritropoyesis y provoca leucocitosis, neutrofilia, linfocitopenia, monocitopenia, y eosinofilia. Los glucocorticoides también suprimen la respuesta inflamatoria e inmune mediante la estabilización de los lisosomas, interfiriendo con la migración de leucocitos, e inhibiendo la fagocitosis. Algunas de las acciones de los glucocorticoides están mediadas a través de sus efectos sobre la producción y acción de los mediadores como las interleukinas e interferones.

La base molecular para las acciones de las hormonas esteroideas se describe en el capítulo 43.

Funciones fisiológicas del Cortisol.

Efectos sobre el metabolismo intermediario

Aumenta la gluconeogénesis.
Aumenta la síntesis de glucógeno
Aumenta de la lipólisis
Aumenta los niveles de glucosa sanguínea.
Disminuye la utilización de la glucosa,

**Efectos sobre el metabolismo proteico.**

Aumenta el catabolismo proteico
Disminuye la síntesis de proteínas.

Efectos sobre la respuesta inmunológica e inflamatoria.

Disminuye la formación de anticuerpos.
Disminuye la circulación de linfocitos, eosinófilos y monocitos
Disminuye la producción e inhibe las acciones de las interleuquinas e interferones,
Estabiliza los lisosomas.
Inhibe la migración de leucocitos.
Inhibe la fagocitosis.

Mineralocorticoides

La aldosterona es el producto principal de la zona glomerular con aproximadamente 200µg producidos por día, aproximadamente un centésimo de la cantidad de cortisol sintetizado diariamente. Las principales funciones fisiológicas de la aldosterona son: (1) regulación del volumen del fluido extracelular y (2) regulación del metabolismo del potasio. Sus acciones están mediadas por una alta afinidad al receptor de mineralocorticoides, encontrada en una variedad de tejidos. Su acción más importante es en las células del túbulo cunvolucionado distal del riñón donde promueve la reabsorción de sodio en intercambio por la excreción de potasio. El agua acompaña pasivamente al transporte de sodio (ver capítulo 24).

El cortisol y otros corticoides como la corticosterona y desoxicorticosterona tienen cierta actividad mineralocorticoide que puede adquirir una importancia clínica cuando los niveles séricos de estos compuestos están elevados. Esto puede ocurrir con los altos niveles de cortisol observados en el síndrome de Cushing. La aldosterona en cambio tiene una débil actividad glucocorticoide, pero su concentración es demasiado baja para tener cualquier efecto fisiológico.

Andrógenos adrenales

Los principales andrógenos secretados por la corteza adrenal son el sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEA-S), dehidroepiandrosterona (DHEA), y androstenodiona. También son secretadas pequeñas cantidades de testosterona (T) y dihidrotestosterona (DHT). La velocidad de producción promedio diaria de la DHEA-S es de aproximadamente 30 mg en un hombre joven y de 20 mg en una mujer joven. La vida media de la DHEA-S está entre 8 y 11 horas, mientras que es solo de 30 a 60 minutos para los andrógenos no conjugados. La producción de andrógenos alcanza un pico entre los 20 y 30 años de edad luego disminuyen regularmente con la edad hasta cerca de un 20% del nivel máximo después de los 70 años. La producción de cortisol en contraste, no cambia con la edad.

Los efectos biológicos de los andrógenos son directos e indirectos. Estos esteroides pueden ser convertidos por tejidos periféricos a las hormonas sexuales primarias testosterona, DHT, y estradiol. Los andrógenos son la principal fuente de testosterona en las mujeres. Se han determinado algunos efectos directos de la DHEA. Puede inhibir la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, un factor importante que controla la síntesis de NADPH, el



cual es requerido por muchas reacciones biológicas importantes incluyendo la lipogénesis. La DHEA también puede tener efectos importantes sobre la regulación inmune.

Catecolaminas

Las catecolaminas que se encuentran naturalmente son la norepinefrina (NE, noradrenalina), la epinefrina (E, adrenalina), y la dopamina. Los principales productos de secreción de la médula suprarrenal son la epinefrina y la norepinefrina. La producción de catecolaminas no está limitada a la médula suprarrenal, sino que también ocurre en las neuronas del sistema nervioso simpático y sistema nervioso central (SNC), y en grupos diseminados de células cromafines encontrados en otras regiones del abdomen y cuello. El principal producto sintetizado en el SNC es la norepinefrina, mientras que la epinefrina es la principal catecolamina producida por las glándulas suprarrenales.

Las acciones fisiológicas de las catecolaminas son diversas. La norepinefrina funciona principalmente como un neurotransmisor. La norepinefrina y la epinefrina tienen influencia sobre el sistema vascular, mientras que la epinefrina afecta los procesos metabólicos como el metabolismo de carbohidratos. Las acciones biológicas de las catecolaminas se inician a través de sus interacciones con dos tipos diferentes de receptores de membrana específicos en las células, los receptores alfa adrenérgicos y los beta adrenérgicos. Estos receptores tienen diferente afinidad por la norepinefrina y la epinefrina y provocan efectos fisiológicos opuestos. La norepinefrina interacciona principalmente con los receptores alfa adrenérgicos, mientras que la epinefrina interacciona con ambos receptores.

La estimulación de los receptores alfa adrenérgicos provoca una vasoconstricción, disminuye la secreción de insulina, sudación, piloerección (“piel de gallina”), y estimulación de la glucogenólisis en el hígado y en el músculo esquelético, provocando un incremento en la concentración sanguínea de glucosa. La estimulación de los beta receptores, sin embargo, conduce a una vasodilatación; estimulación de la liberación de insulina; aumento de la velocidad de contracción cardíaca; relajación de músculo liso en el tracto intestinal; broncodilatación por relajación de los músculos lisos bronquiales; estimulación de la liberación de renina, la cual aumenta la reabsorción de sodio desde los riñones; y aumenta la lipólisis.

Biosíntesis

Adrenocorticosteroides

Todos los procesos de síntesis de los esteroides adrenales comienzan con el colesterol. El colesterol en el tejido adrenal puede ser sintetizado “in situ” a partir de acetato o puede provenir de colesterol hecho en el hígado y transportado a las glándulas suprarrenales por lipoproteínas de baja densidad.

En la Fig. 46-3 se resume el camino biosintético que conduce a los tres grupos principales de esteroides adrenales. Muchas de las reacciones en la esteroidogénesis involucran las enzimas citocromo P-450. El paso limitante en la velocidad de síntesis de todos los esteroides es la conversión de colesterol en pregnenolona. Este paso es estimulado por la ACTH en la zona fascicular y en la zona reticular y por la angiotensina II y III en la zona glomerular. Las vías que conducen a progesterona son comunes en la síntesis de aldosterona y cortisol. En la zona reticular y fascicular, la progesterona es hidrolizada en las posiciones 17, 21 y 11 para formar el cortisol. Bajo circunstancias normales, se sintetizan entre 10 y 30 mg 1872

de cortisol por día. La zona glomerular no posee actividad de 17-hidroxilasa. En lugar de esto, la hidroxilación ocurre en las posiciones 21, 11, y 18; finalmente una reacción de deshidrogenación forma la aldosterona.

Los andrógenos derivan del principal camino de biosíntesis de esteroides luego de la ruptura de la cadena lateral unida al carbono 17 en el anillo D. Ver Capítulo 45 para una descripción de la síntesis de andrógenos. La producción de andrógenos por la glándula suprarrenal es significativa, generando indirectamente un 60% de la testosterona circulante en mujeres, principalmente a través de la conversión de precursores de testosterona en el tejido periférico.

Catecolaminas

En la Fig. 46-4 se muestra la vía bioquímica de la síntesis de catecolaminas. El paso limitante de la velocidad de reacción es la hidroxilación del aminoácido tirosina que lleva a la formación de dihidroxifenilalanina (dopa). Este paso es inhibido por la epinefrina y la norepinefrina. La tirosina proviene de la dieta o de la hidroxilación de la fenilalanina. La dopa es descarboxilada para formar dopamina, la cual es un producto final importante en el SNC donde funciona como neurotransmisor. La dopamina es almacenada en gránulos que están presentes en las neuronas y en la médula adrenal. Dentro de los gránulos, la dopamina β -hidroxilasa convierte la dopamina en norepinefrina. Finalmente, la norepinefrina es liberada de los gránulos de almacenamiento, y la feniletanolamina N-metiltransferasa (FNMT) metila la norepinefrina para formar epinefrina. La FNMT, que se encuentra solamente en la médula adrenal, es inducida por los glucocorticoides (cortisol). Las hormonas de la médula adrenal son almacenadas formando complejos con proteínas (cromogranin A, dopamina- β -hidroxilasa) y adenosin-5'-trifosfato (ATP) en los gránulos cromafines. La estimulación nerviosa provoca una liberación de las catecolaminas almacenadas desde las vesículas por el proceso de exocitosis.

Transporte y Catabolismo

Adrenocorticosteroides

En el plasma, la aldosterona y el cortisol están unidos a proteínas plasmáticas en diferentes grados. La aldosterona existe en estado libre en aproximadamente un 40%, mientras que el cortisol libre en solución es de 4%. La albúmina y la globulina fijadora de corticosteroides (GFC, transcortina, globulina fijadora de cortisol) suman la mayor parte de las uniones de estos dos esteroides. La GFC tiene una alta afinidad y baja capacidad de unión a esteroides, uniendo 90% del cortisol en condiciones normales, mientras que la albúmina tiene baja afinidad y alta capacidad de unir proteínas. La proporción de cortisol en estado libre aumenta cuando la concentración de cortisol excede la capacidad de unión de la GFC (aproximadamente 550 nmo/L). La afinidad de unión de la GFC por el cortisol está reducida en áreas de inflamación. Esto aumenta la concentración de cortisol libre, por lo tanto aumenta su efectividad local. Los niveles de GFC están aumentados en estados hiperestrogénicos como los encontrados en mujeres embarazadas y en mujeres que toman píldoras anticonceptivas que contienen estrógenos. El cortisol libre permanece normal bajo estas circunstancias debido a un aumento compensatorio en el cortisol total. La aldosterona está mucho menos afectada por estos cambios inducidos hormonalmente.

El catabolismo de los esteroides es bastante complejo, y solo es necesaria una corta discusión sobre él para entender la patogénesis y la investigación del laboratorio de los trastornos suprarrenales. Muchos esteroides son catabolizados por el hígado y los riñones. Ejemplos de los tipos de reacciones que son llevadas a cabo incluyen hidroxilación del núcleo esteroide, conjugación con ácido glucorónico, y reducción del doble enlace en el anillo A. Estas transformaciones aumentan la solubilidad en agua de los esteroides, permitiendo su excreción por la orina. Solamente una pequeña porción de aldosterona y cortisol son excretados sin metabolizar en la orina.

La cantidad de cortisol secretado directamente en la orina está relacionada con la proporción de cortisol que circula en forma libre. La GFC está saturada en altas concentraciones fisiológicas de cortisol. Por lo tanto cualquier aumento en el cortisol por encima de este nivel podrá resultar en un pronunciado aumento en la cantidad de cortisol excretado en la orina, siendo así el cortisol libre en orina una prueba valiosa en la investigación del síndrome de Cushing, como se discute posteriormente.

Catecolaminas

Las catecolaminas son estables dentro de los gránulos de almacenamiento de las células de la médula adrenal. Sin embargo, al ser liberadas son rápidamente degradadas por dos enzimas: La catecol-O-metiltransferasa (COMT) y la monoamino oxidasa (MAO) (Fig. 46-5). Solamente una pequeña fracción de la producción de catecolaminas (2%) es excretada sin metabolizar, como catecolaminas libres en la orina. La COMT está presente en muchos tejidos, especialmente en el hígado, los riñones, y en los eritrocitos. Esta enzima metila el grupo hidroxilo C-3 de la norepinefrina y la epinefrina, dando normetanefrina y metanefrina respectivamente. Aproximadamente el 20% de las catecolaminas son excretadas en la orina como metanefrinas. Muchas catecolaminas, sin embargo, son además convertidas en ácido vanililmandélico (AVM) por la acción combinada de la COMT y la MAO; la última es una enzima ubicua que remueve los grupos amino. La medición de catecolaminas libres, metanefrinas, y AVM en la orina puede ser útil en el diagnóstico de enfermedad adrenal medular.

Control y Regulacion

Glucocorticoides

El cortisol liberado desde la corteza suprarrenal está regulado por el eje hipotálamohipofisiario (Fig. 46-6 y capítulo 43). El hipotálamo sintetiza un polipéptido de 41 aminoácidos, la hormona liberadora de corticotropina (CRH), la cual es llevada por la circulación a la glándula hipofisiaria anterior. Allí ella provoca la liberación de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH), un polipéptido de 39 aminoácidos. Los primeros 18 aminoácidos son esenciales para la actividad biológica. La molécula de ACTH interacciona con los receptores de membrana de las células de la corteza suprarrenal y a través de su mensajero secundario, el AMP cíclico, estimula el paso limitante de la velocidad de reacción en la esteroidogénesis (la conversión de colesterol en pregnenolona) conduciendo a la secreción de cortisol. El cortisol circulante libre actúa en forma de retroalimentación negativa para controlar la liberación de ACTH desde la hipófisis. Este sistema de retroalimentación negativa es anulado por los altos centros del cerebro, los cuales establecen la variación diurna

normal de cortisol (Fig. 46-7). Los niveles séricos de cortisol son normalmente altos en la mañana al despertarse y bajos al final de la tarde. Este modelo está principalmente afectado por el ciclo de sueño-vigilia del individuo. Si el ciclo sueño-vigilia está alterado, se requieren de varios días para cambiar dicho patrón. El patrón circadiano de liberación de ACTH está controlado por la secreción de la hormona liberadora corticotrópica (más conocida bajo su abreviatura inglesa CRH para “Corticotropin-Releasing Hormone”) desde el hipotálamo. La liberación a corto plazo de cortisol ocurre por episodios, siguiendo el patrón de ACTH de pulsos aproximadamente cada 2 a 3 minutos. El estrés es otro factor que puede anular la retroinhibición del cortisol sobre la liberación de ACTH. El estrés estimula la liberación de aminas neurogénicas, que a su vez estimula la liberación de CRH. Las citokinas inflamatorias, el factor de necrosis tumoral α , la interleukina-1, y la interleukina-6, también estimulan la liberación de ACTH. Los niveles de ACTH pueden aumentar hasta 10 veces en períodos de estrés, dando lugar a niveles aumentados de cortisol. La hipoglicemia, que es una forma de estrés químico, puede también aumentar la liberación de CRH, conduciendo finalmente a un aumento en el cortisol. Este efecto está mediado por los receptores de glucosa en el hipotálamo.

Mineralocorticoides

En individuos normales tres factores principales controlan la secreción de aldosterona de la zona glomerular: (1) el sistema renina-angiotensina, (2) el potasio, y (3) la ACTH. Bajo circunstancias normales, predomina el sistema renina-angiotensina. La Fig. 46-8 resume la regulación normal de la secreción de aldosterona. Una descripción más detallada se encuentra en el capítulo 24.

La renina es una enzima proteolítica almacenada por células especializadas en la pared de la arteriola aferente del glomérulo. Estas células están asociadas con la *mácula densa*, que es parte del aparato yuxtaglomerular. Un descenso en la presión sanguínea o en la concentración sérica de sodio provocará la liberación de renina. La renina rompe un enlace peptídico en el angiotensinógeno circulante, una proteína secretada por el hígado, liberando un decapeptido llamado *angiotensina I*. La angiotensina I es escindida por la enzima convertidora de la angiotensina (ACE), formando un octapéptido llamado *angiotensina II*. La angiotensina II es un potente vasoconstrictor que aumenta directamente la presión sanguínea. Este péptido también estimula la liberación de aldosterona, la cual provoca retención de sodio y pérdida de potasio. Finalmente, la angiotensina II es convertida en un heptapéptido, *angiotensina III*, por una carboxipeptidasa. La angiotensina III aún retiene la capacidad de estimular la liberación de aldosterona pero tiene poca actividad para inducir aumento de la presión.

El potasio estimula la secreción de aldosterona directamente a nivel suprarrenal. La hiperkalemia estimula y la hipokalemia inhibe la liberación de renina. La ACTH también estimula la secreción de aldosterona directamente; sin embargo, esto es solamente un fenómeno agudo de corta duración. Normalmente hay un ritmo circadiano en la concentración plasmática de aldosterona con valores altos en la mañana. Además, hay alteraciones en los niveles de aldosterona con los cambios de postura. Los niveles plasmáticos van desde 50 a 150 ng/L (140 a 420 pmol/L) en individuos sanos cuando se está reclinado y desde 150 a 300 ng/L (420 a 840 pmol/L) cuando se está erguido. Aproximadamente se secretan entre 150 y 200 μ g de aldosterona por día en circunstancias normales. La dopamina, serotonina, γ -MSH,



beta endorfina, y un factor hipofisiario estimulante de aldosterona no conocido también participan en la regulación de la aldosterona.

Andrógenos suprarrenales

La secreción de andrógenos está parcialmente regulada por la ACTH pero no por las gonadotropinas. La estimulación de la ACTH es variable, y la administración de dexametasona (un corticosteroide sintético) disminuye la producción suprarrenal de andrógenos en grado diferente comparado con el cortisol. En otros ejemplos, como en la pubertad, o en el envejecimiento o enfermedad severa, la producción de cortisol y andrógenos diverge, y tal divergencia indica que otros factores están participando en la regulación de la secreción suprarrenal de andrógenos. Estos factores pueden incluir la disposición de aporte sanguíneo a la corteza suprarrenal, las propiedades intrínsecas de las células adrenocorticales, y otros factores exógenos no conocidos, como los factores hipofisiarios

Catecolaminas

La síntesis de la epinefrina y la norepinefrina está regulada por las concentraciones intracelulares de estas hormonas por retroinhibición, como se discutió previamente. Las catecolaminas son liberadas desde la médula suprarrenal en respuesta a hipotensión, hipoxia, exposición al frío, esfuerzo muscular, dolor, y perturbaciones emocionales.

Condiciones Patológicas

En esta sección se discuten las causas y las características clínicas asociadas con los desórdenes de la corteza suprarrenal y de la médula suprarrenal. En general, la glándula puede hiperfuncionar y producir cantidades en exceso de moléculas bioactivas, o la glándula puede hipofuncionar y secretar muy poco de ciertas moléculas importantes que pueden ser esenciales para el mantenimiento normal de la vida. Las causas patológicas de estos desórdenes pueden ser neoplásicas, hiperplásicas, vasculares, inflamatorias, autoinmunes, infecciosas, hereditarias, o idiopáticas.

Desórdenes de la corteza suprarrenal

Hiperadrenalismo.

Hay tres condiciones básicas asociadas con el hiperadrenalismo, cada una de las cuales puede tener más de una causa. Estas son el síndrome de Cushing, resultado de la producción excesiva de cortisol; hiperaldosteronismo primario, o síndrome de Conn; y la hiperplasia adrenal congénita causada por un bloqueo enzimático en el camino sintético esteroidal.

Síndrome de Cushing. El *síndrome de Cushing* es el término usado para describir cualquier condición resultante de una concentración elevada de glucocorticoides circulantes, generalmente cortisol. El caso más común de exceso de cortisol es la iatrogenia, como consecuencia de altas dosis de cortisol u otros glucocorticoides usados en el manejo de una amplia variedad de problemas clínicos. Las causas no iatrogénicas más comunes son, en orden de prevalencia, tumores hipofisiarios (60%), ACTH ectópica (20%), adenoma y carcinoma adrenal (combinados 20%). La prevalencia estimada del síndrome de Cushing es de aproximadamente 1:10,000 en mujeres y 1:30,000 en hombres. La causa más común en niños



es el carcinoma adrenal.

El síndrome de Cushing puede dividirse en dos grandes categorías: dependiente de ACTH e independiente de ACTH. El síndrome de Cushing dependiente de ACTH es provocado por exceso de ACTH y resulta en una hiperplasia adrenal bilateral. Esto es frecuentemente causado por una secreción autónoma de ACTH por un adenoma hipofisiario benigno, también se le conoce como *enfermedad de Cushing*. Esta condición es más común en mujeres que en hombres (relación M:H de 7:1 ó 8:1). Las fuentes ectópicas de ACTH incluye carcinoma pulmonar (células de avena o células pequeñas) (50%), cáncer del timo (10%), cáncer pancreático (10%), tumores en la cresta neural (5%), carcinoide bronquial (2%), carcinoma medular de la tiroides (5%), y tumores misceláneos (18%). Se conoce ahora que muchos tejidos no endocrinos del cuerpo pueden sintetizar pequeñas cantidades de proopiomelanocortina (POMC), el precursor de la ACTH. Muy pocos tejidos pueden realmente metabolizar el POMC y liberar la ACTH bioactiva. Muchos tumores pulmonares producen POMC, pero solamente el 3% de estos tiene la enzima proteolítica apropiada para liberar la ACTH activa, provocando así el síndrome de Cushing.

En el síndrome de Cushing independiente de ACTH, los niveles séricos de ACTH son bajos debido a la inhibición negativa que resulta de la producción aumentada de cortisol de los carcinomas y adenomas adrenales. El carcinoma adrenal tiene un pronóstico particularmente malo, con la muerte de muchos pacientes en un período de 3 años a pesar de la intervención quirúrgica. Los neoplasmas adrenales son generalmente unilaterales. En los adultos, cerca de la mitad de estos son malignos, mientras que en los niños los neoplasmas de la glándula adrenal son malignos con una mayor frecuencia.

Las causas raras del síndrome de Cushing incluyen la secreción ectópica de CRH, la hiperplasia adrenal macronodular (ACTH elevada y cortisol elevado), hiperplasia nodular pigmentaria primaria (un desorden autoinmune familiar análogo a la enfermedad de Graves), e hipersecreción de cortisol dependiente del polipéptido inhibidor gástrico (PIG) (síndrome de Cushing dependiente de la comida).

El síndrome de Cushing en estados avanzados puede ser fácil de reconocer (ver cuadro más adelante). En los estadios tempranos de la enfermedad, sin embargo, los pacientes pueden tener una amplia variedad de síntomas clínicos que pueden confundirse con otros problemas comunes como la hipertensión idiopática, intolerancia a la glucosa, depresión, y obesidad. El laboratorio juega un papel principal en clasificar el diagnóstico. La obesidad central es una redistribución característica del tejido adiposo con una deposición aumentada alrededor de la cara (cara de luna), en la región supraclavicular, en la región interescapular (espalda de búfalo), y en el eje mesentérico (obesidad troncal). La razón de esto no se conoce. Hallazgos menos comunes incluyen disfunción neuropsiquiátrica, pigmentación, acné, y alcalosis hipokalémica. Se puede ver poliuria porque el cortisol en altas concentraciones puede suprimir la liberación de la hormona antidiurética (ADH). Los problemas neuropsiquiátricos incluyen depresión, comportamiento maniaco, sicosis, e intentos de suicidios.

Principales causas y Características Clínicas del Síndrome de Cushing
Causas



Independiente de ACTH
Adenoma adrenal
Carcinoma adrenal
Dependiente de ACTH
Adenoma hipofisiario secretor de ACTH
(síndrome de Cushing)
ACTH ectópica
Hormona liberadora de corticotropina ectópica
Hiperplasia nodular
Hiperplasia macronodular
Hiperplasia nodular pigmentada primaria
Síndrome de Cushing dependiente del
polipéptido inhibidor gástrico
Iatrogenia
Terapia glucocorticoide
Terapia de ACTH

Características clínicas

Obesidad central
Hipertensión
Intolerancia a la glucosa
Cara hinchada
Estrías púrpuras
Disfunción menstrual
Debilidad muscular
Hirsutismo
Contusiones
Problemas psiquiátricos

El efecto catabólico de los glucocorticoides sobre el metabolismo de proteínas puede manifestarse por las contusiones, estrías (marcas alargadas), osteoporosis, y debilidad muscular. La hipertensión y la hipokalemia pueden ser explicadas por las acciones mineralocorticoides del exceso de cortisol. El hirsutismo, el acné, y la disfunción menstrual, son resultado del exceso de producción de andrógenos, se ven más drásticamente en algunos casos de carcinoma adrenal. La hiperpigmentación algunas veces ocurre en asociación con ACTH ectópica donde los altos niveles de ACTH liberada pueden estar asociados con una liberación aumentada de la actividad estimulante del melanocito, provocando una hiperproducción generalizada de melanina. Algunos pacientes también pueden sufrir de impotencia, disminución de la libido, e infertilidad.

Hiperaldosteronismo. La hipersecreción autónoma primaria de la aldosterona por la zona glomerular es causada primariamente por dos trastornos: (1) un adenoma adrenal productor de aldosterona (APA), o síndrome de Conn (aproximadamente 70% de los casos), y (2) hiperaldosteronismo idiopático (HAI) causado por hiperplasia bilateral (aproximadamente 30% de los casos). La hiperplasia adrenal primaria, que es indistinguible bioquímicamente del APA, puede explicar de 1% a 2% de los pacientes con este problema. Los carcinomas secretores de aldosterona son más raros (<1%). Una forma rara de hiperaldosteronismo primario, el aldosteronismo curable por glucocorticoides (ACG), tiene las características

clínicas de síndrome de Conn pero resulta de una expresión ectópica de la aldosterona sintasa (AS). El ACG, que exhibe una sobreproducción característica de 18-hidroxycortisol, es causado por duplicación quimérica de dos genes unidos, 11- β -hidroxilasa y AS en el cromosoma 8.

La característica clínica principal del hiperaldosteronismo es la hipertensión. La prevalencia estimada de este trastorno en la población hipertensa varía ampliamente pues va desde 0.05% hasta 2.0%. La hipertensión asociada con el hiperaldosteronismo primario se puede explicar por las acciones de la aldosterona, que son la retención del sodio y agua y la disminución de los niveles plasmáticos de potasio (ver capítulo 24). El hallazgo de laboratorio más consistente en los pacientes con aldosteronismo primario es la hipokalemia. La hipokalemia espontánea se presenta en un 80 a 90% de los pacientes. La administración de cloruro de sodio por varios días puede provocar hipokalemia en el resto de los casos. La prevalencia de hiperaldosteronismo primario en los pacientes con hipertensión e hipokalemia espontánea es mayor del 50%. El grado de hipokalemia está afectado parcialmente por la ingesta de sodio. Muchos pacientes con hipokalemia no experimentan síntomas (ver cuadro más adelante). Se puede observar una tolerancia alterada a la glucosa en más de la mitad de los pacientes. La hipokalemia provoca liberación de insulina desde las células beta del páncreas. El sello del hiperaldosteronismo primario es la aldosterona elevada en presencia de la actividad de la renina plasmática suprimida.

El hiperaldosteronismo también puede ser resultado de causas secundarias. En estas situaciones la glándula adrenal no está secretando aldosterona autónomamente pero está respondiendo a una producción y liberación elevada de renina por los riñones, lo cual puede ser desencadenado por pérdida de sodio, disminución de la perfusión renal, estenosis arterial renal, o reducción del volumen vascular. En raras ocasiones la hipersecreción de renina es inapropiada, como en el síndrome de Bartter, un defecto renal en la reabsorción de cloruro, o en pacientes con tumores secretores de renina. Contrariamente al aldosteronismo primario donde la renina está disminuida, en el aldosteronismo secundario la renina plasmática está elevada.

Causas Principales y Características Clínicas de Hiperaldosteronismo Primario(Síndrome de Conn)

Causas

Adenoma adrenal productor de aldosterona, APA
(70% de los casos).
Hiperaldosteronismo idiopático, HAI (30% de los casos)

Características clínicas

Hipertensión
Síntomas resultantes de la hipokalemia.
 Debilidad muscular
 Poliuria y polidipsia
 Cambios en el ECG
 Intolerancia a la glucosa



Hiperplasia adrenal congénita. La hiperplasia adrenal congénita, o síndrome adrenogenital, describe a un grupo de errores congénitos del metabolismo que son causados por deficiencias en las enzimas de las vías biosintéticas de producción del cortisol y la aldosterona. Existen por lo menos seis distintos defectos heredables en esta vía, el más común es la deficiencia de la 21-hidroxilasa, que explica el 95% de todos los casos de hiperplasia adrenal congénita. Este defecto enzimático conduce a una producción disminuida de cortisol, lo cual resulta en niveles aumentados de ACTH. Esto a la vez estimula la hiperplasia adrenal y la producción de esteroides como una forma en que el organismo intenta superar la deficiencia enzimática. El bloqueo generalmente es parcial, y el paciente puede ser capaz de mantener los niveles de cortisol y aldosterona, bajo circunstancias normales a expensas de la acumulación de precursores esteroidales que son desviados hacia otros caminos metabólicos. Comúnmente existe hipersecreción de varios andrógenos incluyendo DHEA y androstenediona, la cual luego de una conversión periférica a testosterona, puede conducir a la pubertad precoz en hombres y a variados grados de masculinización y disfunciones sexuales en las mujeres.

Los síntomas en la hiperplasia adrenal congénita están relacionados con la disminución del producto final del metabolismo y con la acumulación de sus precursores. En el caso de la deficiencia de la 21-hidroxilasa, la acumulación de 17-hidroxiprogesterona provoca una tendencia a la pérdida de sal. Los niveles plasmáticos de renina aumentan en respuesta, originando una mayor demanda para la síntesis de aldosterona, la cual también requiere de la actividad de la 21-hidroxilasa. Si la deficiencia es parcial, la tendencia a la pérdida de sal es compensada. Si es más completa, puede ocurrir una pérdida de sal más severa y es más común una crisis addisoniana (ver pág.923). La variante en la que no hay pérdida de sal de esta condición, observada en dos terceras partes de los pacientes, está principalmente caracterizada por los problemas asociados con los andrógenos aumentados. Deficiencias más severas pueden manifestarse en la niñez. Las deficiencias menos severas pueden no ser clínicamente evidentes hasta después de la pubertad. Sin tratamiento el exceso de andrógeno provoca un desarrollo precoz en hombres y mujeres con rápido crecimiento, vello púbico, y acné a edad temprana. Hay también oclusión epifisial prematura. Problemas adicionales para las mujeres incluyen clitoromegalia, engrosamiento de la voz, aumento de la masa muscular, fallas en el desarrollo del seno, amenorrea primaria, y pelo facial.

La deficiencia de 21-hidroxilasa se hereda como un rasgo autosómico recesivo con una frecuencia heterocigota estimada de aproximadamente 1 en 50 de la población. La frecuencia aproximada de deficiencia de 21-hidroxilasa homocigota causante de hiperplasia adrenal congénita es de 1 en 10,000 nacimientos (relación H:M de 1:1). La deficiencia de 21-hidroxilasa no clásica, moderada, es mucho menos común, con una prevalencia de 1 en 1000 en la población en general. En algunas poblaciones la prevalencia es mucho mayor, por ejemplo, entre los judíos Ashkenazi puede ser hasta de 1 en 30. Debido a la gran incidencia la hiperplasia adrenal congénita, se ha cuestionado si esta condición es una enfermedad.

La deficiencia de 11-hidroxilasa es la segunda causa más común de hiperplasia adrenal. De nuevo, dependiendo de la severidad de la deficiencia, la producción de cortisol puede ser adecuada o no. La única característica de esta deficiencia enzimática es la acumulación de 11-desoxicorticosterona, un precursor en el camino de la aldosterona. Este esteroide promueve la reabsorción de sodio y por lo tanto causa hipertensión. También es un problema el exceso de producción de andrógenos.

El tratamiento para las dos formas de hiperplasia adrenal congénita arriba mencionadas



es simplemente terapia de reemplazo de glucocorticoides. Las pacientes mujeres requieren además corrección quirúrgica para los órganos genitales ambiguos. Los paciente hombres tienden a responder bien a la terapia, mientras que las mujeres, a pesar de una adecuada terapia, tienen una alta incidencia de trastornos de identidad sexual, infertilidad, hirsutismo, y virilización.

Hipoadrenalismo

La hipofunción o insuficiencia adrenal puede ser causada por: (1) enfermedad adrenal primaria, involucrando toda la corteza adrenal; (2) insuficiencia adrenal secundaria provocada por niveles disminuidos de CRH o ACTH como resultado de enfermedad hipofisiaria o hipotalámica; o (3) supresión a largo plazo del eje adrenal hipofisiario hipotalámico por glucocorticoides, lo que conduce a una atrofia adrenal. La insuficiencia adrenal provocada por disminución en la ACTH o CRH se discute más en el capítulo 43.

Enfermedad de Addison. La hipofunción o insuficiencia adrenal primaria, es conocida como la enfermedad de Addison, es relativamente infrecuente (su prevalencia estimada es de 1 en 50000). Actualmente la mayor causa de enfermedad de Addison, a la que se le atribuyen alrededor del 70 % de todos los casos, es una adrenalitis autoinmune con anticuerpos adrenales circulantes. Este desorden, explica el 70% de la enfermedad de Addison y pueden estar asociado con otros desordenes autoinmunes como la tiroiditis de Hashimoto, el hipoparatiroidismo, la diabetes mellitus, la anemia perniciosa, el vitiligo, y la falla ovárica primaria. Otras causas de disfunción adrenal primaria están enumeradas en el cuadro mas adelante. La tuberculosis fue la causa principal de la falla renal en la primera mitad del siglo 20.

Los síntomas de la enfermedad de Addison aparecen después de que alrededor del 90% de la corteza adrenal se ha destruido (ver el cuadro). La enfermedad usualmente se desarrolla lentamente con una pérdida progresiva de los niveles de cortisol y un aumento de ACTH, provocando una hiperpigmentación en los pacientes debido a la propiedad hormonal melanocito estimulante de la ACTH. Debido coincidentemente a una deficiencia de aldosterona hay una pérdida de sodio y una retención de potasio. Puede presentarse una hipoglicemia debido a una deficiencia de cortisol. Estos síntomas pueden ser vagos y no específicos. Sin embargo algunos pacientes pueden ser vistos con una enfermedad aguda que pone en riesgo la vida, la cual es conocida como *crisis addisoniana*, posterior al estrés causado por enfermedad, cirugía, o trauma. La crisis addisoniana es el resultado de una deficiencia aguda tanto de mineralocorticoides como de glucocorticoides. Los signos de una crisis addisoniana, que están enumerados en el cuadro pueden evolucionar rápidamente hacia un choque circulatorio. Los hallazgos comunes de laboratorio son la hiperkalemia e hiponatremia junto a una hemoconcentración y niveles elevados de urea, resultante de la pérdida de fluidos. La hiperkalemia puede ser lo suficientemente severa como para conducir a arritmias y paro cardíaco.

La hiperplasia adrenal congénita discutida previamente, puede resultar en una insuficiencia adrenal primaria. Ciertas drogas como la metirapona, usadas en el síndrome de Cushing, o-p'-DDD (mitotan), usada en el tratamiento de cáncer adrenal, y otros agentes terapéuticos como el Ketoconazol y Etomidato, que interfieren en los vías sintéticas de los esteroides, todos tienen el potencial de causar una insuficiencia adrenal primaria.

En pacientes masculinos la forma de adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma X

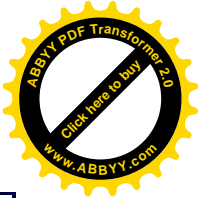


(ALD), también debe ser considerada en el diagnóstico diferencial de la insuficiencia adrenal primaria. Esto ocurre más frecuentemente de lo que se ha reconocido, por encima del 40% de los hombres con enfermedad de Addison tiene este problema. El defecto es causado por una deficiencia de la enzima peroxisomal (lignoceroil CoA ligasa), que causa una disminución de la oxidación y por lo tanto en una acumulación de los ácidos grasos de cadena larga (AGCLs). Se han encontrado cambios patológicos en la corteza adrenal, testículos, materia blanca del SNC y sistema periférico nervioso. Las células de la glándula adrenal en los tejidos de las zonas fascicular y reticular se hinchan con inclusiones lamelares consistentes en ésteres de colesterol de AGCLs y eventualmente se atrofian y mueren. Los pacientes con ALD pueden presentar solo insuficiencia adrenal, problemas adrenales o neurológicos, o problemas neurológicos solamente. Los problemas neurológicos incluyen la inestabilidad emocional, falla en el aprendizaje, e hiperactividad que progresan hacia trastornos visuales, desmielinización cerebral difusa, convulsiones, deterioro mental y muerte.

La insuficiencia adrenal primaria en el ALD es debida principalmente a una disminución de la reserva de cortisol. La insuficiencia gonadal primaria se presenta en aproximadamente 20% de los pacientes con disminución de la testosterona y aumento de las gonadotropinas.

Los pacientes con insuficiencia adrenal secundaria usualmente no experimentan síntomas relacionados al hipoaldosteronismo porque la síntesis de aldosterona y su secreción dependen más del sistema renina-angiotensina que de la ACTH. La hiperpigmentación no es una característica de este desorden, sin embargo los pacientes con insuficiencia adrenal secundaria pueden mostrar otros signos de enfermedad hipotalámica o hiposfariaria, incluyendo hipogonadismo e hipotiroidismo concomitantemente. Los síntomas comunes tanto de enfermedad primaria o secundaria de la corteza adrenal incluyen debilidad, hipoglicemia pérdida de peso y trastornos gastrointestinales.

Causas Principales y Características Clínicas de la Insuficiencia Adrenal Primaria
Causas Adrenalitis autoinmune Enfermedad granulomatosa Tuberculosis Histoplasmosis Sarcoidosis Infiltración neoplásica Hemocromatosis Amiloidosis Adrenalectomía bilateral Infarto Enfermedad infecciosa Fármacos (metirapona, Ketoconazol, 0,p'-DDD) Adrenoleucodistrofia Hiperplasia adrenal congénita
Características clínicas Debilidad muscular Fatiga



Pérdida de peso
Hipotensión ortostática
Pigmentación
Anorexia
Crisis addisoniana
Fiebre
Deshidratación
Nauseas
Hipotensión
Choque
Dolores abdominales

Desordenes de la médula adrenal: feocromocitoma

El feocromocitoma es usualmente un tumor benigno, relativamente infrecuente proveniente de las células cromafines provocando una hipersecreción de catecolaminas, epinefrina y norepinefrina. Se ha estimado que por lo menos el 0.1% de los pacientes con hipertensión diastólica persistente pueden tener este tumor, aunque es una causa poco común de hipertensión es importante su diagnóstico porque es quirúrgicamente curable, y más aun importante, porque puede ser la causa de muerte por ataques hipertensivos agudos. Este tumor puede presentarse como un problema aislado a cualquier edad, por ejemplo el 10% de los feocromocitomas se han encontrado en niños. La incidencia global es estimada en 1 o 2 por 100,000. La incidencia por autopsia es considerablemente mayor, ya que se ha estimado en alrededor del 0,3%. Habitualmente se diagnostica el feocromocitoma entre la tercera a quinta década de vida.

Aproximadamente el 90% de los feocromocotomas se producen en las glándulas adrenales, y el resto ocurre en células cromafines extraadrenales, en cualquier parte desde la base del cerebro hasta el bajo abdomen. Aproximadamente el 10% de los feocromocitomas son bilaterales o múltiples y aproximadamente el 10% son malignos. El feocromocitoma también puede ser un padecimiento hereditario. En este caso puede estar asociado con neoplasias endocrinas múltiples (NEM) tipo II, síndrome que se manifiesta con feocromocitoma hiperparatiroidismo, carcinoma medular de la tiroides, o MEN tipo III, que se manifiesta como neuromas múltiples de la mucosa, carcinoma medular de la tiroides, y feocromocitoma. También hay una significativa asociación con neurofibromatosis (enfermedad de von Recklinghausen) y con la enfermedad de von Hippel-Lindau.

El feocromocitoma puede liberar sus hormonas en forma continua o episódica. Clínicamente el hallazgo más significativo es una hipertensión persistente o paroxística; otro hallazgo común esta enumerado en el cuadro correspondiente. Varios de los síntomas pueden ser persistentes o episódicos. Los episodios pueden ocurrir con una frecuencia que va desde uno cada pocas semanas hasta 20 a 30 veces diarias, con ataques que persisten menos de un minuto o tan largos como una semana. El patrón sintomático depende de la catecolamina específica secretada por el tumor.

Raramente el problema clínico resulta ser la hipotensión. Este es el caso cuando el tumor primario secreta epinefrina, dopa o dopamina. Algunos pacientes pueden presentar al principio hipertrofia o falla cardíaca. Debe remarcarse que los síntomas clínicos son frecuentemente sutiles. El médico debe tener excelente capacidad de respuesta clínica. Los síntomas asociados, cuando se presentan, no son específicos para el feocromocitoma. Una



causa de muerte común en pacientes con feocromocitoma no sospechado son las crisis hipertensivas o hipotensivas producidas por una cirugía. Los ataques paroxísticos pueden ser producidos por palpación del tumor cambios posturales, traumas emocionales y rara vez en problemas en la micción (en casos de los pocos frecuentes tumores de vejiga).

Causas Principales y Características Clínicas del Feocromocitoma

Causas

Tumor benigno de las células cromafines adrenales (80%)
Tumor maligno de las células cromafines adrenales (10%)
Tumor extra adrenal de las células cromafines (10%)

Características clínicas

Hipertensión episódica o sostenida
Dolor de cabeza
Sudación
Palpitaciones con o sin taquicardias
Irritabilidad
Pérdida de peso
Nausea
Debilidad o fatiga
Menos comunes:
 Ruborización
 Disnea
 Mareos

Cambop del Compuesto Analizado en la Enfermedad(Tabla 46-1)

Hiperadrenalismo

Síndrome de Cushing

El primer paso en la investigación de laboratorio en el síndrome de Cushing es establecer que el paciente tenga realmente una producción autónoma de cortisol o síndrome de Cushing. Una vez establecido esto, el próximo paso es diferenciar la causa del síndrome de Cushing.

Uno de las pruebas más simples y más importantes de realizar inicialmente es la prueba de supresión nocturna de la dexametasona. La dexametasona es un glucocorticoide sintético que es 30 veces más potente que el cortisol. Al paciente se le da una tableta conteniendo 1 mg de dexametasona y se le instruye de tomarlo a las 11:00 PM y acudir al laboratorio para la determinación del cortisol plasmático a los 8:00 de la mañana siguiente. Un nivel cortisol por la mañana menor de 140nmol/L (50 µg/L) usualmente excluye toda causa de hipercortisolismo, esta es una respuesta normal. Niveles mayores que 280 nmol/L (100 µg/L) indican hipercortisolismo. Esta prueba ha reportado una sensibilidad del 98% para el síndrome de Cushing.

Una especificidad que no es tan buena así como resultados falsos positivos pueden ser vistos en pacientes con algunas formas de depresión mental, estrés inducido por hipercortisolismo, síndrome de pseudoCushing resultante de alcoholismo crónico y aumento de los niveles de globulina unida a cortisol asociados con el embarazo o el uso de píldoras anticonceptivas. Los resultados falsos positivos también pueden verse en pacientes que

reciben medicamentos como fenitoína o rifampicina, los cuales aumentan la velocidad de depuración de la dexametasona. Sin embargo la prueba de supresión de dexametasona permanece como una prueba de exploración ideal para el síndrome de Cushing, ya que los resultados falsos negativos son un problema más importante que los resultados falsos positivos en los procedimientos de exploración. Para minimizar los resultados falsos negativos, algunos centros da atención a la salud disminuyen la supresión de cortisol esperados hasta valores por debajo de 85 nmol/L (30µg/L).

Otra prueba inicial útil de investigación es la estimación de los niveles de cortisol libre en orina de 24 horas. Esto es en esencia una medida directa de la cantidad de cortisol no unido a las proteínas plasmáticas, y por consiguiente es excretado en orina sin metabolizar luego de un período de 24 Horas. Esta prueba también tiene una buena sensibilidad, 95%, para el síndrome de Cushing. La determinación de cortisol de 24 horas en orina requiere conjuntamente una determinación de creatinina urinaria para asegurar una recolección adecuada. La medida de otros metabolitos esteroides en orina que reflejan la salida de glucocorticoides tales como los 17-hidroxycorticosteroides y 17- esteroides cetogénicos no son considerados confiables.

Una prueba tradicional que ya no forma parte de la evaluación estándar del síndrome de Cushing, es la determinación en la mañana y en la tarde del cortisol sérico. Los valores de cortisol plasmáticos usualmente muestran una variación diurna, teniendo los mayores niveles en la mañana y los niveles más bajos en la tarde. Los valores de la tarde son usualmente menores del 50 % de los de la mañana. Clásicamente, las muestras son tomadas a las 8:00 AM y el intervalo de referencia es de 140 a 660 nmol/L, (50-239 µg/L) y 4:00 PM con un intervalo de referencia de 50 a 330 nmol/L (18- 119µg/L). Muchos pacientes con el síndrome de Cushing no muestran esta variación diurna y tendrán elevadas concentraciones en ambos tiempos de colecta. Sin embargo, la liberación de cortisol es episódica y hay un considerable traslape entre pacientes sanos y pacientes con este síndrome. Para diferenciar pacientes con el síndrome de Cushing de pacientes sanos lo mejor es tomar la muestra en el momento que el cortisol está usualmente en su menor concentración en la circulación. Este tiempo ocurre a la medianoche y debido a que no es práctico tomar una muestra a esta hora, se escoge las 4 PM. Los niveles de cortisol plasmáticos mayores de 420 nmol/L (152 µg/L) a esta hora son altamente sugestivos de hipercortisolismo. La pérdida en la variación diurna puede ocurrir por estrés, anorexia, obesidad, y disturbios emocionales, o puede ser un efecto secundario a sedativos, estimulantes, o drogas sicotrópicas o antiepilépticas.

Otra variación de la prueba de supresión nocturna de dexametasona, es la prueba de supresión de dexametasona a baja dosis, que puede también ser usada para confirmar que el paciente tiene un síndrome de Cushing. Esta prueba lleva más tiempo y no está incluida en algunos de los recientes protocolos de esta enfermedad. Actualmente se sigue que ir directamente a la prueba de supresión de dexametasona de dosis alta, que se discutirá posteriormente. En la prueba clásica de supresión de dexametasona de dosis baja se le da al paciente una dosis total de 2 mg de dexametasona por día durante 2 días en dosis de 0.5 mg cada 6 horas. Esta dosis es equivalente a aproximadamente 4 veces la salida adrenal usual. Durante el segundo día se recoge una muestra de orina de 24 horas para cortisol libre. También se puede realizar el análisis de cortisol plasmático. Los pacientes con el síndrome de Cushing generalmente no van a mostrar una importante supresión de la salida de cortisol con



esta dosis de dexametasona. Los pacientes normales mostrarán una supresión mayor del 50% de la salida del cortisol urinario presente antes de realizar la prueba. El cortisol urinario usualmente cae a niveles tan bajos como 50 nmol/L (18µg/L) y el cortisol de la mañana cae por debajo de 140 nmol/L (50µg/L).

Existen diversas estrategias que pueden ser usadas para determinar la causa del síndrome de Cushing, una puede ser la realización de la prueba de supresión de dosis alta de dexametasona. Esto puede ser realizado como un procedimiento nocturno usando 8 mg de dexametasona, o puede ser llevado a cabo durante 2 días dando un total de 8 mg por día dividido en 4 alícuotas de 2 mg cada 6 Horas. La respuesta puede ser determinada por mediciones del cortisol plasmático o cortisol libre en orina de 24 horas. Los pacientes con tumores de hipófisis que secretan exceso de ACTH (enfermedad de Cushing), mostrarán una supresión mayor del 50% de la salida de glucocorticoides luego de una prueba de supresión de dexametasona de dosis alta, debido a que los tumores de hipófisis producen aún una respuesta de retroalimentación negativa, por lo que se requieren niveles más alto de corticosteroides que lo normal.

Los pacientes con tumores adrenales o fuentes ectópicas de ACTH pueden darán resultados negativos en la muestra de supresión de glucocorticoides. Sin embargo suelen ocurrir respuestas anómalas.

Los niveles plasmáticos de ACTH pueden ser medidos por radioinmunoensayo y son esenciales en la determinación de la causa específica del síndrome de Cushing. La ACTH es una hormona polipeptídica lábil que requiere precauciones especiales en su manipulación. Las muestras de plasma deben ser recolectadas en hielo y el plasma debe ser separado en una centrífuga refrigerada y almacenado en congelación. Actualmente la ACTH puede ser medida mediante un ensayo inmunoradiométrico de dos sitios, obteniendo mejor precisión, especificidad, y sensibilidad que el radioinmunoensayo tradicional competitivo. Los nuevos ensayos no miden los fragmentos de ACTH y no reaccionan bien con la ACTH “grande”, un precursor de la ACTH, que se produce en algunos tumores. Los niveles de ACTH en el límite superiores del intervalo de referencia (<11.4 pmol/L) y hasta dos veces el límite superior normal son consistentes con una causa hipofisiaria del síndrome de Cushing. Los niveles no detectables de ACTH (< 2 pmol/L) son sugestivos de un tumor adrenal. Los niveles muy altos de ACTH (< 50 pmol/L), son sugestivos de una fuente ectópica, por ejemplo un tumor maligno. Hay cierta sobreposición en la concentración plasmática de ACTH asociada con causas ectópicas o hipofisiarias en el síndrome de Cushing.

La prueba de estimulación de metirapona puede también ser usada para definir la causa del síndrome de Cushing. La metirapona actúa por inhibición de la enzima 11-hidroxilasa y por lo tanto bloquea la síntesis de cortisol. En pacientes sanos los niveles de cortisol caen y los niveles de ACTH aumentarán debido a la pérdida de la inhibición de la retroalimentación negativa del cortisol. La respuesta a la metirapona puede ser determinada por medición ya sea en suero o plasma del 11-desoxicortisol, o en orina del 17-hidroxicorticoesterol. Se recomienda el siguiente protocolo: primero, medir la línea basal del cortisol sérico y los valores en suero del 11-desoxicortisol a las 8 AM. Dar al paciente 750 mg de metirapona cada 4 horas por 24 horas y entonces repetir la medición del cortisol sérico y del 11-desoxicortisol. En el síndrome de Cushing causado por un tumor hipofisiario, la respuesta de ACTH permanece intacta y los niveles de 11-desoxicortisol aumentan a niveles mayores

que 200 nmol/l, los niveles del 11-desoxicortisol por debajo de este valor son consistentes con un tumor adrenal o ACTH ectópica. Algunos investigadores han sugerido que esta prueba puede ser mejor que la prueba de la supresión de dexametasona a dosis altas para determinar la causa del síndrome de Cushing, sin embargo muchos laboratorios no realizan este protocolo.

Si la ACTH está suprimida en un paciente con el síndrome de Cushing, usualmente un examen con TC resultará exitoso para la identificación de una lesión adrenal. Los adenomas adrenales son usualmente obvios porque el tejido adyacente adrenal normal y el contralateral adrenal se atrofian. Con el carcinoma adrenal la glándula es usualmente muy grande, con dimensiones que exceden los 6 cm. Otras características que pueden ayudar a distinguir entre un adenoma adrenal y un carcinoma incluyen un aumento en la producción de andrógenos asociada con el carcinoma adrenal; los tumores benignos pueden responder a la ACTH y los tumores malignos son generalmente pleomórficos e invasivos.

Las causas que hacen más difícil diferenciar los síndromes de Cushing son la producción ectópica de ACTH y el adenoma hipofisiario. La diferenciación no fue necesaria hasta 1970 porque la adrenalectomía bilateral fue el tratamiento estándar para ambos. Al final de los 1970s la cirugía transesfenoidal vino a ser el tratamiento de elección en el adenoma hipofisiario. Subsecuentemente resultó claro que no todos los pacientes con un adenoma hipofisiario aparente tenían este problema. Los pacientes con carcinoides bronquiales, muy frecuentemente tenían parámetros bioquímicos incluyendo ACTH y resultados de la prueba de supresión de dexametasona de alta dosis similares a los pacientes con la enfermedad de Cushing. Estos tumores de crecimiento lento no se manifestaban radiológicamente por años en algunos casos. Las técnicas de generación de imágenes hipofisiarias pueden dar altos porcentajes de resultados falsos positivos y falsos negativos. Los resultados falsos negativos son usualmente un problema con pequeños tumores hipofisiarios. Los resultados falsos positivos se producen debido a la alta incidencia de tumores no funcionales de hipófisis. Se espera que la prueba de estimulación de la hormona de liberación de corticotropina (CRH) pueda ser más útil. En principio los tumores secretores de ACTH usualmente retienen receptores de CRH y después de la administración de 100 µg de CRH responderán con un súbito aumento de liberación de ACTH. Los pacientes con otras causas del síndrome de Cushing teóricamente no mostrarían respuesta. Desafortunadamente, como en las pruebas previamente discutidas, se presentan falsos positivos y falsos negativos. La exactitud diagnóstica global de la prueba de estimulación de CRH es aproximadamente del 90%, lo cual es solo marginalmente mejor que la de la prueba la supresión de dexametasona a dosis altas.

La prueba que actualmente es considerada definitiva para diferenciar las causas hipofisiarias del síndrome de Cushing de otras causas, es un muestreo de seno petroso inferior bilateral después de la administración de CRH. En esta prueba un radiólogo inserta un catéter en ambos senos petrosos inferiores, que drenan desde la hipófisis anterior. Muestras venosas son tomadas antes y 2, 5, y 10 minutos después de la administración intravenosa de 100 µg de CRH. El gradiente de ACTH entre el seno petroso inferior y los sitios venosos periféricos luego de la estimulación de CRH es mayor que 2 o 3 si el paciente tiene un tumor hipofisiario. El gradiente promedio visto en pacientes con tumor hipofisiario secretor de CRH es de alrededor de 50. Un gradiente menor de 2 indica una fuente no hipofisiaria de ACTH. Ya que las muestras son tomadas simultáneamente del seno derecho e izquierdo es posible localizar el

tumor en el sitio derecho o izquierdo en la hipófisis anterior en alrededor del 80% de los casos. Esta es una información útil para procedimientos quirúrgicos posteriores. Si no hay una lesión identificable el cirujano puede remover solo el lado derecho o izquierdo de la hipófisis disminuyendo el riesgo de una panhipófisis.

Los procedimientos de los senos petrosos demandan y requieren un radiólogo muy diestro, por lo tanto no todos están de acuerdo en que esta prueba deba ser realizada rutinariamente en todos los pacientes que se sospecha que tengan un tumor de hipófisis. Datos del Instituto Nacional de Salud indican que el 50% de supresión la salida de cortisol por dosis altas de dexametasona pueden ser inadecuados para confirmar que el paciente tiene un tumor de hipófisis. Ellos recomiendan que la confirmación de un diagnóstico de tumor hipofisiario del paciente debe establecerse sólo cuando el cortisol libre en orina ha disminuido un 90% del valor basal. En sus experiencias, ningún paciente con ACTH ectópica experimenta supresión de cortisol en este grado. El protocolo de muestreo petroso más invasivo descrito anteriormente puede entonces ser reservado para aquellos pacientes que muestran solo una supresión parcial de la excreción urinaria de cortisol.

El síndrome hipofisiario de Cushing es mucho más común en las mujeres que en los hombres con una relación H:M de 7 ó 8 a 1. Mientras que para la ACTH ectópica la relación es aproximadamente igual. Un 40% de los hombres con síndrome de Cushing puede tener un origen de ACTH ectópico. Como se menciona anteriormente la presencia de carcinoides bronquiales pueden causar confusión en el protocolo diagnóstico. El muestreo de la vena petrosa para ACTH ayuda a resolver esta confusión. La localización de los carcinoides bronquiales persiste como un problema porque éstos son pequeños y de crecimiento lento. Estos tumores son benignos en su comienzo pero son potencialmente malignos y deben ser determinados.

En resumen, si se sospecha que un paciente tiene el síndrome de Cushing, se debe comenzar con una prueba de supresión de dexametasona nocturna y después confirmar un resultado positivo con una prueba de cortisol libre en orina de 24 horas, con o sin una subsiguiente prueba de supresión de dexametasona a dosis baja. Para determinar la causa del síndrome de Cushing, son útiles las mediciones de ACTH en orina y suero y la respuesta de cortisol a dexametasona a dosis altas. En los centros hospitalarios donde la CRH está disponible, puede ser usada la medición de la ACTH en respuesta a la administración de CRH para determinar la causa del exceso del cortisol. Finalmente si el resultado de la investigación no es definitivo hay que realizar un muestreo de los senos petrosos bilaterales para ACTH, luego de la administración de CRH, esto debe proporcionar un diagnóstico definitivo. Ver Fig. 46-9 que resume el protocolo de diagnóstico.

Hiperaldosteronismo primario.

El síndrome de Conn o hiperaldosteronismo primario es una causa poco frecuente de hipertensión. El proceso de investigación que lleva al diagnóstico de este desorden es costoso y consume mucho tiempo, por lo tanto los pacientes con hipertensión son investigados para esta enfermedad sólo cuando está indicado. Un esquema para la investigación del hiperaldosteronismo primario está subrayado en la Fig. 46-10. El laboratorio debe tener una participación importante en el asesoramiento sobre la recolección y manipuleo de las muestras requeridas para esta costosa investigación, y así asegurar un resultado exitoso. El método más simple para el estudio de esta enfermedad es medir potasio en suero y orina cuando el paciente

no esta recibiendo diuréticos. Existe sospecha de aldosteronismo primario en los pacientes con hipokalemia espontánea. También se debe tener sospecha en aquellos que se vuelven hipokalémicos con una alta dieta salada o en aquellos que desarrollan muy rápidamente hipokalemia cuando toman diuréticos. Si el potasio está disminuido, el próximo paso en la investigación es determinar los valores de sodio y potasio en orina de 24 horas. Los valores en suero por debajo de 3,5 mmol/L acompañados de una velocidad de excreción de potasio urinario mayor de 30 nmol/24horas no se observan generalmente con hipertensión esencial, pero esta situación es común en el hiperaldosteronismo primario. El sodio de la orina de 24 horas debe ser mayor o igual a 100 mmol/L para que el valor del potasio resulte válido; una baja ingesta de sodio puede disminuir la excreción de potasio y dar resultados falsamente negativos.

Este muestreo no es enteramente confiable porque el potasio sérico dentro del intervalo de referencia puede ser observado en algunos pacientes con hiperaldosteronismo primario. Esta prueba debe ser repetida en 2 o 3 ocasiones. La confirmación del diagnóstico de aldosteronismo primario depende de la demostración en suero de una concentración de renina disminuida y aldosterona aumentada. Los diuréticos y espironolactona deben ser discontinuados por lo menos 4 semanas antes de la evaluación del paciente.

La aldosterona es generalmente medida bajo condiciones que suprimen su secreción. La forma más simple de llevar a cabo este análisis es prescribir al paciente un régimen que comprende una ingesta muy moderada de sodio por una semana (> 100 mmol/día). La aldosterona plasmática es entonces medida en la mañana con el paciente en posición supina, una segunda muestra se toma 4 horas después de que el paciente adopta una posición erguida, es usada para mediciones en plasma de la actividad de la aldosterona y la renina. El diagnóstico de un aldosteronismo primario es confirmado si la aldosterona plasmática supina es mayor de 150 ng/L (420 pmol/L) y la actividad de la renina en posición erecta es menor de 1 ng/mL/hora. Una medida simultánea de aldosterona en orina colectada durante 24 horas debe ser mayor de 65 μ g/día en un paciente con síndrome de Conn.

Otro enfoque consiste en medir la aldosterona plasmática supina antes y después de la infusión de 2 L de una solución salina normal después de un lapso de 4 horas. Los pacientes normales y los pacientes con hipertensión esencial suprimirán su aldosterona plasmática a valores menores de 50 ng/L (140pmol/L). Esta prueba no es aconsejable en pacientes con evidencia de falla cardíaca. Dado que el paciente debe ser cuidadosamente monitoreado, la realización de esta prueba resulta costosa.

La actividad de la renina plasmática puede también ser medida luego del cambio de una dieta baja en sal (< 20 mmol/día) por 3 días, o luego de una dieta baja en sal de 1 día seguida por una ingestión de 40 mg de furosemide, tomada 3 veces al día. Una muestra de plasma se toma al día siguiente luego de 4 horas de posición erguida. Este procedimiento causa abatimiento de sal y agua. Los pacientes normales y pacientes con hipertensión esencial responderán con un aumento en la actividad de la renina, mientras que pacientes con hiperaldosteronismo primario no van a responder y la actividad se mantiene baja.

La baja actividad de la renina plasmática puede también ser observada con hiperplasia adrenal congénita causada por deficiencia de la 11-hidroxilasa, excesiva ingestión de regaliz, e hipertensión esencial con renina disminuida.

Si los resultados son ambiguos, la “prueba del captopril” puede ser útil. El captopril es una droga usada para el tratamiento de pacientes con hipertensión. Su mecanismo de acción



primario es la inhibición de la enzima convertidora de la angiotensina, la cual convierte la angiotensina I en angiotensina II. Los pacientes sin síndrome de Conn responderán con una reducción de la aldosterona plasmática, pero los pacientes con síndrome de Conn no disminuirán los niveles de aldosterona. La aldosterona se mide generalmente entre 2 a 3 horas luego de una dosis oral de captopril de 25 mg. La respuesta esperada es que la aldosterona plasmática debe disminuir a $< 100 \text{ ng/L}$ ($< 280 \text{ pmol/L}$).

Una vez que ha sido establecido el diagnóstico de aldosteronismo primario, debe ser determinada la causa de esta enfermedad para poder elegir el curso apropiado del tratamiento. La adrenalectomía quirúrgica está indicada para adenoma productor de aldosterona (APA), mientras que la terapia médica se requiere para hiperaldosteronismo idiopático (HAI). Varias pruebas pueden ser usadas para realizar esta tarea. La disponibilidad y exactitud de estas pruebas varía, y un enfoque directo empleando generación de imagen radiológica está limitado porque las lesiones asociadas con el aldosteronismo primario pueden ser pequeñas ($< 2 \text{ cm}$). También, son bastante comunes las masas adrenales no funcionales y pueden dar resultados falso positivos. La exactitud total de la técnica de producción de imágenes es solamente de 75%. Se han visto resultados ligeramente mejores cuando se han usado las respuestas bioquímicas a los cambios de postura. En pacientes con APA, los niveles de aldosterona pueden disminuir luego de asumir una postura erecta, mientras que en pacientes con HAI, la aldosterona generalmente aumenta. Esto indica que la actividad de la renina plasmática (ARP) puede aún estar involucrada en la regulación de la aldosterona en los pacientes con HAI a pesar de los niveles bajos de ARP. Otra diferencia bioquímica que puede ser medida involucra la 18-hidroxycorticosterona. Esta sustancia es mayor en pacientes con APA que en pacientes con HAI, aunque esta prueba tiene disponibilidad limitada.

La producción de imágenes adrenales con yodocolesterol marcado radioactivamente puede ubicar con exactitud el tumor en un 90% de los pacientes con APA. El colesterol marcado con ^{131}I debe ser administrado luego de tratamiento con dexametasona para reducir la incorporación por el tejido adrenal sano.

El mejor procedimiento para localizar la lesión es el muestreo venoso adrenal bilateral. La relación de concentración ipsilateral a contralateral de aldosterona sérica es generalmente mayor que 10:1. El éxito de este procedimiento depende de la habilidad del radiólogo para colocar el catéter. Los resultados pueden mejorarse por determinación simultánea de cortisol estimulado por ACTH de ambas venas adrenales, la cual debe ser simétrica. Aunque esta prueba es considerada estándar, se reserva generalmente para aquellos casos donde las pruebas simples son inconclusas.

Luego de la adrenalectomía para el APA, el 70% de los pacientes son normotensos 1 año más tarde. Las drogas como el amiloride y la espironolactona han sido usadas para el tratamiento de HAI. Sorprendentemente, algunos pacientes responden a los inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina. Tal respuesta, nuevamente indica que la angiotensina II puede jugar un papel en el HAI.

Hiperplasia adrenal congénita.

La incidencia reportada de hiperplasia adrenal congénita (CAH) oscila desde 1:5000 a 1:62,000 nacimientos. La causa más común es una deficiencia de 21-hidroxilasa, que suma el 95% de todos los casos. Un niño con este desorden puede tener evidencia de insuficiencia adrenal, como se discutió previamente, y puede ser investigado desde este punto de vista, como se explicará en la próxima sección de este capítulo. Sin embargo, el niño puede también



sufrir las consecuencias bioquímicas del exceso de andrógeno, las mujeres muestran signos de virilización y los hombres presentan pubertad precoz. La prueba definitiva en esta situación es el hallazgo de un nivel elevado de 17-hidroxiprogesterona sérica, el precursor inmediato al bloqueo metabólico. La medición de testosterona en suero y pregnanetriol, un metabolito de la 17-hidroxiprogesterona, en la orina puede también ser útil. La medición de la 17-hidroxiprogesterona en suero es también útil en el seguimiento del desarrollo de la terapia de reemplazo de glucocorticoides en pacientes con deficiencia de 21-hidroxilasa. El intervalo de referencia normal para la 17-hidroxiprogesterona es de 0.5 a 3 nmol/L. Los niveles pueden ser mayores en sangre materna y sangre fetal normales, pero caen drásticamente después del nacimiento y se alcanzan los niveles adultos normales entre 2 y 7 días. Los individuos homocigotos para la deficiencia de 21-hidroxilasa tienen niveles de 17-hidroxiprogesterona en el rango de 300 a 3000 nmol/L, mientras que los heterocigotos tienen niveles entre 3 y 30 nmol/L. Una deficiencia de 11-hidroxilasa puede también conducir a la virilización o pubertad precoz pero está más frecuentemente asociada con la hipertensión y puede ser mejor diagnosticada por medición del desoxicortisol en suero o plasma. Las pruebas de diagnóstico para las otras formas de hiperplasia adrenal congénita no se discuten debido a la frecuencia sumamente baja de estos desórdenes.

Hipoadrenalismo o insuficiencia adrenal primaria (enfermedad de Addison)

Cuando un paciente tiene hipotensión ortostática (postural), sodio sérico reducido, y aumento de potasio sérico, se debe considerar la posibilidad de una insuficiencia adrenal primaria, o enfermedad de Addison. Las muestras deben ser recogidas inmediatamente para las determinaciones de ACTH y cortisol basal. Las determinaciones de aldosterona pueden también ser útiles pero generalmente no se realizan. Los pacientes con hipoadrenalismo pueden tener niveles de cortisol dentro del intervalo de referencia si es que tienen una reserva adrenal inadecuada. En estos casos debe realizarse una prueba de estimulación de ACTH. Puede ser inyectada por vía intravenosa o intramuscular una forma sintética de ACTH (cosyntropin, Cortrosyn), formado por los primeros 24 aminoácidos de la ACTH. Entonces, se deben tomar muestras de sangre para el cortisol sérico a los 30 a 60 minutos después de la inyección. Una respuesta normal para esta prueba de estimulación (ACTH) a cosyntropin se manifiesta como un alza en el cortisol sérico desde por lo menos 280 nmol/L (100 µg/L) hasta un nivel mayor que 550 nmol/L (200 µg/L), a menos que el valor basal ya rebase los 550 nmol/L. Un resultado bajo de cortisol basal con falta de respuesta a la ACTH puede sugerir falla adrenal primaria o puede ser un resultado de atrofia causada por terapia de largo plazo con esteroides o insuficiencia hipofisiaria. En la insuficiencia adrenal primaria los niveles de ACTH se elevarán mucho (más de 50 pmol/L) y de hecho pueden ser clínicamente evidentes a causa de la hiperpigmentación del paciente. En la insuficiencia adrenal secundaria o atrofia resultante de esteroides exógenos, los niveles de ACTH se suprimirán (menos de 10 pmol/L).

Si la respuesta a la prueba de estimulación de Cortrosyn es anormal y se sospecha de insuficiencia adrenal secundaria, se debe realizar una prueba de estimulación de ACTH prolongada (3 a 5 días) o una prueba de estrés hipoglucémico inducido por insulina. La administración intravenosa de ACTH por varios días generalmente produce un incremento gradual en la salida de cortisol si la insuficiencia adrenal es el resultado de la deficiencia de largo plazo de ACTH de la hipófisis. La hipoglicemia comúnmente estimula la liberación de

ACTH de la hipófisis. Cuando no se observa ACTH o cortisol aumentados en respuesta a la hipoglicemia, es posible que exista enfermedad hipofisiaria o hipotalámica. La prueba de estimulación de CRH puede también ser usada y produciría resultados comparables a los de la prueba de la hipoglicemia por insulina. Esta prueba sería mucho más segura, aunque la CRH no está aún disponible generalmente en todos los centros de diagnóstico.

La prueba de estimulación de metirapona es también usada algunas veces en la investigación de la insuficiencia adrenal. Se puede seguir un protocolo similar al señalado anteriormente. Una respuesta normal usualmente resulta en niveles incrementados de 11-desoxicortisol en el suero o una excreción aumentada de 17-hidroxycorticosteroides en la orina. No hay una respuesta o una inadecuada respuesta en ambos casos de insuficiencia adrenal primaria y secundaria. Se muestra un esquema simplificado para la investigación de la insuficiencia adrenal en la Fig. 46-11.

La insuficiencia adrenal transitoria puede resultar del uso prolongado de glucocorticoides, los cuales inhiben la liberación de ACTH y CRH provocando atrofia de la corteza adrenal. La terapia con glucocorticoides por períodos cortos es rápidamente reversible, pero terapias con altas dosis períodos largos de tiempo pueden resultar en insuficiencia adrenal por lo menos hasta por 2 años después de que se discontinuó la medicación con esteroides, y los pacientes están en riesgo de un colapso cardiovascular cuando dicho estrés es muy severo. Es imposible de predecir cuales pacientes tendrán un problema, y por lo tanto debe realizarse rutinariamente una evaluación de laboratorio de la reserva adrenal. Si un cortisol al azar es mayor que 400 nmol/L (145 µg/L), hay poca probabilidad de un problema. Sin embargo, la mejor evaluación para la capacidad de reserva es la prueba de estimulación de ACTH discutida anteriormente.

La adrenoleucodistrofia, que puede también ser una causa de insuficiencia adrenal en hombres, se diagnostica por medición de los niveles aumentados de ácidos grasos saturados de cadena larga en plasma (C_{26:0}, C_{25:0}, C_{24:0}), glóbulos rojos, glóbulos blancos, o fibroblastos cultivados. Este ensayo está disponible en muchos centros. La generación de imágenes por resonancia magnética puede también mostrar lesiones características de la materia blanca.

Feocromocitoma

Hay muchos caminos para investigar el feocromocitoma. Se puede medir el ácido vainillilmandélico (AVM) urinario, las metanefrinas, las catecolaminas totales, o catecolaminas fraccionadas. Además, se pueden medir la epinefrina y la norepinefrina en plasma. La mayoría de los métodos usados para medir estos compuestos son específicos, pero muchos fármacos como los inhibidores de la monoamino oxidasa y la reserpina pueden alterar el metabolismo de las catecolaminas y pueden interferir en la interpretación de los resultados. El paciente no debe recibir ninguna medicación, si es posible, antes de comenzar la investigación del laboratorio. Idealmente debería recolectarse una muestra de orina de 24 horas cuando el paciente no está recibiendo ninguna droga o bajo ningún estrés y está clínicamente estable. Con nuevos métodos más específicos disponibles hoy en día, no se requieren restricciones dietarias. No obstante, muchas drogas pueden afectar el metabolismo de las catecolaminas directamente o pueden interferir con sus mediciones. Esto es particularmente cierto para los métodos espectrofotométricos y fluorimétricos. Las concentraciones elevadas de catecolaminas pueden estar asociadas con la administración de catecolaminas exógenas

(encontrados en gotas nasales y supresores del apetito), anfetaminas, vasodilatadores, antagonistas de los receptores alfa adrenérgicos (prazosin y fentolamina), diuréticos con hiponatremia, cafeína, fumar cigarrillos y marihuana, beta bloqueadores, y antidepresivos tricíclicos. Hay otros agentes farmacológicos que pueden disminuir los niveles de catecolaminas, incluyendo clonidina, bromocriptina, dexametasona, e inhibidores de la monoamino oxidasa.

La mayoría de la literatura indica que una determinación de metanefrina en orina de 24 horas (intervalo de referencia, menos que 5 $\mu\text{mol/día}$) puede ser la mejor prueba exploratoria para el feocromocitoma, con una sensibilidad entre 98% y 99%. Los métodos de HPLC para el análisis de AVM (intervalo de referencia, entre 10 y 35 $\mu\text{mol/día}$) no son tan sensibles, con una sensibilidad reportada de 90% para el feocromocitoma. La literatura más reciente indica que la cuantificación de catecolaminas libres fraccionadas en orina puede ser la prueba más sensible y específica en la investigación del feocromocitoma (sensibilidad > 95%). Un problema que persiste es que los pacientes con hipertensión por otras causas pueden tener desviaciones en el límite de las catecolaminas y sus metabolitos. En los pacientes con feocromocitoma, el hallazgo más común obtenido después del fraccionamiento de las catecolaminas urinarias es un nivel aumentado de norepinefrina con pequeños incrementos o niveles normales de epinefrina y dopamina. Un patrón menos común es un pronunciado aumento en ambas norepinefrina y epinefrina con un pequeño aumento de dopamina. Un patrón raro consiste en un aumento pronunciado en la epinefrina con pequeños aumentos o niveles normales de norepinefrina y dopamina. Este último perfil se ve solamente en asociación con tumores adrenales. Algunos feocromocitomas malignos pueden secretar principalmente grandes cantidades de dopamina. Este es el resultado de una deficiencia de la dopamina- β -hidroxilasa en células malignas. Los toques de los intervalos de referencia en orina para norepinefrina, epinefrina, y dopamina son de 470, 160, y 3300 nmol/día respectivamente. Un aumento de la norepinefrina urinaria es uno de los hallazgos más específicos asociados con el feocromocitoma cuando se usa como nivel de decisión un valor mayor que 900 nmol/día (aproximadamente 2 veces el intervalo de referencia superior). A esta concentración, la especificidad del ensayo se mejora mucho sin pérdida de sensibilidad. Las medidas de norepinefrina urinaria son especialmente útiles cuando el paciente tiene hipertensión episódica de corta duración. Una recolección al azar de orina después de un ataque puede indicar excreción anormal de catecolaminas, mientras las concentraciones de los metabolitos pueden ser normales.

Ha habido un considerable interés en las mediciones de catecolaminas plasmáticas, especialmente en combinación con la prueba de supresión de clonidina. El análisis de catecolaminas plasmáticas es muy difícil porque las concentraciones son muy bajas y los compuestos muy lábiles. Muchas condiciones pueden provocar elevación de las catecolaminas plasmáticas en el rango observado en pacientes con feocromocitoma, incluyendo reducción de volumen, ansiedad, ejercicio, anorexia, fumar, insuficiencia renal, obesidad, y varios fármacos como la L-dopa y la metildopa. La sensibilidad de las mediciones de catecolaminas plasmáticas para el diagnóstico de feocromocitoma puede ser tan alto como el 95%, pero la especificidad es subóptima. El uso de niveles de decisión más altos y más específicos causa una reducción en la sensibilidad. Con las catecolaminas plasmáticas, a pesar de las precauciones para minimizar el estrés durante el período de evaluación, una porción



importante de pacientes con hipertensión esencial puede tener concentraciones plasmáticas de norepinefrina en el rango erróneo, que puede ser el resultado de una actividad aumentada del sistema nervioso simpático (SNS).

La medición de catecolaminas en orina de 24 horas tiene varias ventajas. La recolección de orina induce estrés mínimo en el paciente, y la integración de la producción de catecolaminas en 24 horas minimiza las fluctuaciones en la actividad del SNS. Además, las concentraciones considerablemente más altas del compuesto analizado en la muestra de orina hacen que el procedimiento sea menos demandante técnicamente.

La prueba de supresión de clonidina puede ser de alguna utilidad en los diagnósticos difíciles. Las catecolaminas plasmáticas son medidas antes y 3 horas después de la administración de 0.3 mg de clonidina. Los pacientes con feocromocitoma no muestran supresión, mientras que los pacientes con hipertensión esencial suprimen sus niveles de catecolaminas en el intervalo de referencia. Se obtienen mejores resultados con métodos que son específicos para catecolaminas libres. Sí se incluyen las catecolaminas conjugadas, las cuales tienen vidas medias más largas, pueden aparecer resultados falsos positivos. Una modificación reciente de este protocolo involucra mediciones de catecolaminas en orina en una muestra cronometrada después de la administración de clonidina.

La localización del tumor antes de la cirugía se puede llevar a cabo con la ayuda de la exploración con CT, muestreo venoso para catecolaminas, producción de imágenes radioisotópicas con metayodo [¹³¹I]benzilguanidina, y resonancia magnética de imágenes.

Es importante el diagnóstico del feocromocitoma tempranamente debido a la potencial crisis hipertensiva que pone en riesgo la vida, que puede ser provocada por un procedimiento quirúrgico, trauma mayor, o ciertas drogas usadas en el tratamiento de la depresión o la hipertensión. Las indicaciones para las pruebas del feocromocitoma incluyen la lista de signos y síntomas descritos en la sección anterior. Una masa adrenal, que puede ser un hallazgo accidental en un CT, debe ser considerado un potencial feocromocitoma, y este diagnóstico debe descartarse antes de realizar cualquier procedimiento quirúrgico. El feocromocitoma también debe considerarse en cualquier paciente con una historia de hipertensión después de una anestesia general o trauma. Finalmente, la verificación para feocromocitoma debe iniciarse en pacientes con carcinoma medular o de la tiroides o con historia familiar de neoplasias exocrinas múltiples tipo II o tipo III.

Resumiendo, no es suficiente una prueba simple o una muestra de orina de 24 horas para definir el diagnóstico. Si la sospecha clínica es alta, se justifica analizar más de una muestra de orina y ordenar determinaciones de catecolaminas libres y los metabolitos. Deben seleccionarse los pacientes apropiados mediante análisis urinarios de 24 horas de catecolaminas libres fraccionadas, preferentemente analizados por métodos de HPLC combinados con detección electroquímica u otros métodos específicos. Los resultados erróneos deben ser confirmados por el análisis de AVM o metanefrina en orina de 24 horas. Ha habido un interés reciente en la determinación de metanefrinas fraccionadas por HPLC. El procedimiento analítico es más complicado que para las catecolaminas fraccionadas, pero puede resultar ser más sensible como un tamizaje. Se puede necesitar que estas pruebas se realicen más de una ocasión. En los pacientes con hipertensión episódica puede ser útil un análisis de una muestra de orina al azar para catecolaminas libres fraccionadas. En los casos muy difíciles puede ser de utilidad, la prueba de supresión de clonidina combinada con mediciones de catecolaminas plasmáticas.



Parte II. HIPERTENSIÓN

Definición y Criterios

La hipertensión crónica es un problema común de los países industrializados, afectando aproximadamente al 25% de la población adulta. El aumento de la presión sanguínea individual aumenta el riesgo de desarrollar enfermedad cardíaca, accidente vascular, daño renal, y enfermedad periférica vascular. El riesgo del desarrollo de estas complicaciones lleva a disminuir los valores medios de la presión sanguínea de la población. Por lo cual toda definición de hipertensión es puramente arbitraria. Otros factores como el tabaquismo y la hiperlipidemia aumentan el riesgo de hipertensión asociada a complicaciones.

El criterio de hipertensión definida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) es el de una presión sistólica mayor de 160 mm Hg o una presión diastólica mayor de 90 mm Hg, (Tabla 46-2). Es importante que el diagnóstico de hipertensión no se haga con base a una sola medición, dado que el estrés de la visita al médico es suficiente para elevar la presión sanguínea en algunas personas.

Es importante el reconocimiento de la hipertensión ya que es tratable y el tratamiento reduce la incidencia de complicaciones. Las pruebas de laboratorio pueden ser usadas a fin de determinar el curso de algunas complicaciones de la hipertensión y también son importantes para detectar pacientes con hipertensión secundaria curable. Esto puede liberar a los pacientes hipertensos de una terapia costosa de por vida, la magnitud y costo de una terapia médica pueden estar asociados por sí mismas con las complicaciones.

Factores que Regulan la Presión Sanguínea Normal

Para una mejor comprensión de la patofisiología de la hipertensión, es necesario primero revisar los factores responsables de una presión sanguínea normal. La capacidad cardíaca y la resistencia vascular periférica son los determinantes primarios de la presión sanguínea sistémica. La capacidad cardíaca está determinada por el volumen de plasma, el volumen de cada impulso (el volumen de sangre que expelle el corazón con cada contracción), la velocidad cardíaca y la contractilidad miocárdica. La resistencia vascular periférica es función del balance de la vasoconstricción humoral (para aumentar la presión sanguínea), y vasodilatación (para disminuir la presión sanguínea), actividad adrenérgica, y el tono muscular liso de la arteriola. Comúnmente la presión sanguínea está ajustada para mantener una suficiente perfusión de los órganos sin producir daño vascular u orgánico. Varios sistemas juegan un papel en la modulación del rendimiento cardíaco y la resistencia vascular periférica. Estos son los barorreceptores arteriales reflejos, sistemas reguladores de los fluidos orgánicos o del volumen plasmático y la autorregulación vascular.

Los barorreceptores en el arco aórtico y las arterias carotídeas son sensibles la presión



de perfusión y la tensión de la pared. Estos sensores envían las señales al tallo cerebral a través del sistema nervioso autónomo aferente para modular la actividad nerviosa adrenérgica y vagal eferente, que regula la contractilidad miocárdica, pulso cardíaco, y la resistencia vascular periférica. La secreción de hormona antidiurética del hipotálamo es regulada por la osmolaridad plasmática y la presión sanguínea. Esta hormona mejora la reabsorción de agua por los riñones.

El sistema renina-angiotensina estimula la secreción de aldosterona cuando la presión sanguínea o la concentración de sodio cae, conduciendo a la conservación de sodio y agua. La angiotensina II generada por esta cascada es también un potente vasoconstrictor. Este sistema ha sido descrito con más detalle anteriormente en este capítulo.

Las arteriolas tienen la capacidad intrínseca de alterar el tono muscular en respuesta a presiones de perfusión local. Con este sistema vascular autorregulatorio, cuando el rendimiento cardíaco aumenta, las arteriolas se contraen para proteger los capilares y los tejidos de la hiperperfusión.

Todos estos sistemas trabajan en conjunto cuando se producen cambios en la presión sanguínea. En la Tabla 46-3 se resumen algunos de los factores que juegan un papel en la regulación de la presión sanguínea. A través de nuestro entendimiento de la fisiología del control de la presión sanguínea han evolucionado nuevos agentes terapéuticos específicos para el tratamiento de la hipertensión.

Condiciones Patológicas

La causa de la hipertensión en la mayoría de los pacientes es desconocida. Las causas definidas como la enfermedad renal vascular, falla renal crónica, o anomalías endocrinas no son comunes y acontecen como máximo en el 5% a 10% de los casos. Los factores desconocidos genéticos o ambientales pueden jugar un papel en aproximadamente en el 95% de los pacientes con hipertensión primaria o esencial.

Existen varias evidencias que la ingesta de sal, de alcohol, y la obesidad pueden tener una influencia importante.

Está fuera del alcance de este capítulo profundizar dentro de varias teorías sobre los mecanismos que llevan a la hipertensión primaria. Se puede simplemente establecer que el camino final es el aumento de la vasoconstricción periférica vascular. El factor iniciador no es conocido.

Hipertensión Primaria

Las dos grandes categorías en hipertensión son, hipertensión primaria o “esencial” e hipertensión secundaria. La causa de hipertensión primaria es desconocida y es improbable que una sola causa explique la diversidad de desequilibrios hemodinámicos patofisiológicos de esta condición. Pueden estar participando factores hereditarios y ambientales (ingesta de sal, estrés, obesidad y alcohol). El sistema nervioso simpático y el sistema angiotensina-renina han sido los más frecuentemente implicados como fuente del problema. Un pulso elevado en reposo, es a veces un predictor temprano de una futura hipertensión. Algunos pero no todos los individuos con hipertensión tienen una producción mayor de catecolaminas. La actividad



de la renina plasmática es usualmente normal en los hipertensos, pero puede estar deprimida en algunos (aproximadamente 25%) y elevada en otros (aproximadamente 15%), la fase maligna (acelerada) de la hipertensión es casi siempre acompañada de un aumento de renina.

Inicialmente puede haber un solo desequilibrio, pero la hipertensión parece generar hipertensión, y otros mecanismos vienen a participar con el tiempo a medida que la hipertensión continúa. Esto puede explicar por que la hipertensión secundaria no siempre se cura cuando se corrige el defecto primario.

Muchos otros factores han sido implicados. Se desconoce si éstos son causales o es simplemente un epifenómeno. Se ha informado defectos en el transporte de sodio a través de las paredes celulares, ya sea atribuibles a una disfunción de la ATPasa de Na^+ y K^+ o debido al aumento de la permeabilidad al sodio. También se ha especulado de sí la hipertensión puede resultar de una deficiencia en vasodilatadores más que de un exceso de vasoconstrictores. En este punto no hay una sola hipótesis unificada.

Hipertensión secundaria.

Aunque las causas secundarias de la hipertensión ocurren solo en el 5% a 10% de todos los casos, es importante su reconocimiento porque hay mayor terapia médica específica y mayor cura quirúrgica. La Tabla 46-4 resume las causas principales de hipertensión.

Enfermedad Renal

La causa mayor de hipertensión secundaria es la enfermedad renal. La glomerulonefritis, pielonefritis, enfermedad policística renal, tumores secretores de renina, e insuficiencia renal crónica, están todas asociadas a la hipertensión.

Hipertensión renovascular.

La estenosis, oclusión de una o ambas arterias o ramas mayores, puede causar hipertensión por estimulación de la secreción de renina de las células yuxtaglomerulares del riñón afectado. Se requiere más del 60% de oclusión para tener un efecto hemodinámico importante. En pacientes mayores de 50 años de edad, la aterosclerosis es la causa más importante. En pacientes más jóvenes la displasia fibromuscular es la causa mayor. La hipertensión renovascular o estenosis de la arteria renal, es la causa más recuente de la hipertensión secundaria curable, pero se ha encontrado sólo en el 2% de pacientes hipertensos. Debe sospecharse hipertensión renovascular cuando la hipertensión se desarrolla rápidamente en menores de 30 años o en los mayores de 55 años, o cuando hay un empeoramiento súbito en una hipertensión previamente estable. El hallazgo físico más importante es un sonido sistólico-diastólico en el epigastrio, pero este signo está presente solo en el 50% de los pacientes.

Hipertensión inducida por fármacos.

Varios agentes farmacológicos pueden producir hipertensión. Los anticonceptivos orales pueden producir una hipertensión de mediano grado a través del aumento de la producción hepática de angiotensina (sustrato de la renina). Os anticonceptivos orales a su vez pueden producir directamente cierto grado de retención de sodio.

El regaliz y carbenoxolona también causan la retención de agua y sodio, aumentando la



actividad de los mineralocorticoides. Los descongestionantes nasales pueden producir hipertensión por vasoconstricción. Los glucocorticoides administrados en exceso pueden aumentar la actividad de los mineralocorticoides. Lo expuesto es ejemplifica una pequeña parte de las causas de hipertensión inducida por fármacos.

Estrechez aórtica.

La estrechez de aorta es usualmente identificada en la niñez. En estas condiciones hay un defecto arterial con una estructura aórtica fibrosa reduciendo el flujo sanguíneo a la parte inferior del cuerpo y extremidades. El resultado es una reducción del flujo sanguíneo a los riñones y como consecuencia la activación del sistema renina-angiotensina. Estos pacientes van a tener entonces una mayor hipertensión de las extremidades superiores con relación a las extremidades inferiores. Un ruido suave que se intensifica en la espalda, se oye frecuentemente en el sitio de la estrechez. El pulso femoral está disminuido y retardado comparado con el pulso braquial.

Causas endocrinas de hipertensión.

Diversos desórdenes adrenales están asociados con la hipertensión. Estos incluyen el síndrome de Cushing, feocromocitoma, y síndrome de Conn. Las causas, manifestaciones clínicas, e investigación de laboratorio de estos problemas se han resumido en la primera sección de este capítulo. Otros trastornos endocrinos que se pueden asociar con la hipertensión son la acromegalia, hiperparatiroidismo primario (50% son hipertensos), hipoparatiroidismo (raramente hipertenso), y tirotoxicosis (alta presión sistólica).

Complicaciones de la Hipertensión

La presión sanguínea puede aumentar gradualmente en el curso de varios años, y el paciente puede permanecer asintomático por largo tiempo. La hipertensión es usualmente descubierta en un examen físico de rutina. Desafortunadamente es descubierta frecuentemente después de haberse producido un daño en un órgano vital, como una lesión isquémica al cerebro luego de un accidente vascular o un daño cardíaco después de un infarto al miocardio. Los dolores de cabeza o mareos, son síntomas algunas veces asociados con hipertensión, que se ven en menos del 25% de los pacientes y el examen físico no es usualmente indicado.

Años de hipertensión no controlada pueden producir daños en varios órganos vitales en particular ojos, cerebro, corazón riñones, y la aorta.

En los ojos pueden producirse, hemorragias retinales, exudados, y edema papilar. La hipertensión es un riesgo muy importante de accidente vascular. La resistencia periférica en la hipertensión es alta, una condición que aumenta con la con la sobrecarga posterior del ventrículo izquierdo, originando una hipertrofia ventricular izquierda. La hipertensión también acelera la aterogénesis. Una prolongada hipertensión induce daño vascular y glomerular en los riñones, causando nefroesclerosis. Los vasos sanguíneos renales muestran engrosamiento fibrótico aterosclerótico y angostamiento del lumen. Se daña la capacidad del riñón para regular el flujo sanguíneo. La glomeruloesclerosis se inicia con un aumento de la proteinuria. Esto eventualmente lleva a una pérdida de la velocidad de filtración glomerular y a una

enfermedad renal terminal. La aterosclerosis de los vasos mayores, incluyendo la aorta, se acelera por la hipertensión. Puede producirse aneurisma aórtico y disección intramural. El aneurisma se desarrolla lentamente y puede ser asintomático, mientras que la disección ocurre siempre como un episodio doloroso y se acompaña frecuentemente por un choque.

Evaluación Mínima de la Hipertensión Individual

Historia completa y examen físico
Concentraciones séricas de creatinina, sodio, potasio, glucosa, ácido úrico, colesterol y triglicéridos.
Hemoglobina
Uroanálisis
Electrocardiograma

Cambio del Compuesto Analizado en la Enfermedad

Una vez que la hipertensión ha sido determinada en un paciente a través de múltiples determinaciones de la presión sanguínea, debe iniciarse una simple y mínima evaluación (ver el cuadro para un resumen). Esta evaluación tiene tres propósitos mayores: (1) excluir las causas de una hipertensión secundaria tratable, (2) detectar evidencias de trastorno orgánico, e (3) identificar otros factores de riesgo que puedan acelerar una enfermedad cardiovascular. Esta evaluación puede involucrar una cantidad importante de costosas pruebas de laboratorio. La elección de las pruebas se justifica más adelante.

Uroanálisis

Los análisis de orina de rutina pueden detectar proteinuria, hematuria, y glucosuria. La proteinuria y hematuria pueden ser atribuibles a nefroesclerosis hipertensiva o a una enfermedad renal intrínseca, que puede ser la causa de la hipertensión. Se requiere una biopsia renal si se observa una anormalidad a fin de determinar la causa de la misma. La presencia de proteinuria en un paciente hipertenso puede sugerir un mal pronóstico. Hay interés en diagnosticar este problema en etapas tempranas usando pruebas sensibles para albúmina (microalbuminuria) análoga a la de la nefropatía diabética. Es posible revertir el proceso, por ejemplo mediante el uso de inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina. La presencia de glucosuria, que sugiere una diabetes mellitus, afectará la elección de la terapia antihipertensiva. Por ejemplo, los diuréticos de tiazida están contraindicados en la diabetes porque pueden aumentar la intolerancia a la glucosa. Es posible que la intolerancia a la glucosa sea secundaria a otras causas endocrinas de hipertensión como el feocromocitoma, síndrome de Cushing, o acromegalia.

Sodio

Un resultado de sodio elevado no es una prueba específica ni sensible pero puede estar elevado en algunos pacientes con hiperaldosterismo primario. Otra consideración es que el sodio puede estar disminuido en pacientes hipertenso que reciben tiazida o diuréticos del asa. Este prueba es importante para monitorear pacientes bajo terapia diurética.



Potasio

El hallazgo de un valor de potasio bajo en pacientes hipertensos que no reciben medicación es un dato importante que sugiere una hipertensión primaria (síndrome de Conn) o secundaria (es decir una estenosis arterial renal) como el hiperaldosteonismo. También el potasio sérico puede estar aumentado en pacientes con falla renal aguda o crónica, o disminuido en pacientes que reciben diuréticos.

Creatinina

La creatinina es un marcador importante de daño renal que puede ser causado por hipertensión o ser la causa de la hipertensión. La creatinina debe ser evaluada al inicio del tratamiento y luego anualmente en todos los hipertensos.

Calcio

El nivel de calcio sérico es elevado en el hiperparatiroidismo primario, que es una de las causas de la hipertensión. Alrededor del 50% de los pacientes con este problema son hipertensos. Es interesante que a pesar de esta relación, la presión sanguínea menudo no se normaliza después de la recuperación quirúrgica. Otra consideración es que los diuréticos de tiazida rara vez pueden producir hipercalcemia y por lo tanto deben ser excluidos cuando se busca la causa de un hiperparatiroidismo primario.

Acido úrico

El ácido úrico está elevado en alrededor del 40% de los pacientes con hipertensión esencial. La relación no es clara pero es más común en los pacientes con falla renal. El ácido úrico puede estar elevado por diuréticos de tiazida, en algunos casos conduce al desarrollo de la gota.

Glucosa

Una glucosa elevada en ayunas mayor que 1400mg/l en dos o más ocasiones, es suficiente para permitir el diagnóstico de diabetes mellitus. Alrededor del 50% de los diabéticos tienen hipertensión y hasta el 10% de los pacientes hipertensos son diabéticos. Los medicamentos de preferencia para los diabéticos son los bloqueadores de los canales del calcio e inhibidores de la enzima inhibitoria de la conversión de la angiotensina. Deben ser evitados los diuréticos de tiazida y beta bloqueadores.

Colesterol

La presencia de hiperlipidemia es un factor importante de riesgo para la aterosclerosis junto con la hipertensión. La presencia de hiperlipidemia es una contraindicación para el uso de algunas medicaciones antihipertensivas, como los beta bloqueadores y diuréticos de la tiazida, que exacerban el problema lipídico.

Electrocardiograma.

En todos los casos se debe obtener un electrocardiograma para evaluar el estado cardíaco como parámetro de referencia para determinar si hay hipertrofia del ventrículo izquierdo.



Rayos X de tórax

Una placa de tórax puede identificar una dilatación aórtica o elongación e incisión de costilla puede producir una contracción de la aorta.

Gama glutamil transpeptidasa

Esta es una prueba opcional que sirve tamizaje del abuso de alcohol. El consumo de alcohol puede elevar la presión sanguínea. Una onza de alcohol por día, equivalente a alrededor de dos tragos, aumentará la presión sistólica un promedio de 2 a 6 mmHg.

Estudios Secundarios

Indicios en la historia, examen físico, y estudios básicos de laboratorio pueden indicar una causa posible de hipertensión secundaria, algunos de estos hallazgos pueden ser:

1. Un comienzo abrupto de una severa hipertensión antes de los 25 años o después de los 50 puede sugerir un feocromocitoma o enfermedad vascular renal.
2. Una historia de palpitaciones, ataques de ansiedad, sudación, hiperglucemia y pérdida de peso puede ser sugestivo de un feocromocitoma.
3. Una cavitación abdominal puede ser sugestiva de una enfermedad renovascular.
4. Una masa bilateral abdominal superior en un examen físico puede implicar enfermedad de riñón poliquístico.
5. Resultados de pruebas renales anormales pueden sugerir una insuficiencia renal.
6. Hipokalemia en un hipertenso no tratado o una hipokalemia fácilmente inducible puede dirigir a la búsqueda de hiperaldosterismo o síndrome de Conn.

La investigación de un desorden adrenal asociado a hipertensión ya fue discutida antes en este capítulo. Con base a los signos clínicos se sospechan otras causas endocrinas de hipertensión y las investigaciones de laboratorio de estos desordenes se verán en otros capítulos. El enfoque en este punto será en la investigación de hipertensión vascular renal.

Hipertensión renovascular

La prueba estándar de tamizaje para determinar hipertensión renal vascular ha sido un pielograma intravenoso de secuencia rápida (PIV). Anormalidades en la excreción por contraste y la forma y tamaño del riñón puede sugerir este desorden. La prueba definitiva para una corrección quirúrgica de la estenosis renal arterial hasta hace poco tiempo ha sido la combinación de un angiograma renal y determinaciones de la renina de la vena renal. El angiograma puede identificar la lesión estenótica mientras que la cateterización bilateral de la arterial renal y medición subsecuente de la actividad de la renina confirman la importancia funcional de la lesión observada. La angosta arteria renal vierte menos sangre hacia el riñón afectado, y la secreción de renina es más elevada en este sitio. Una relación de renina de la vena renal mayor de 1.5:1 se asocia con la cura o mejoramiento de la hipertensión después de la angioplastia o intervención quirúrgica en el 80% de los casos. Antes de la realización de esta prueba el paciente no debe recibir beta bloqueadores, que pueden suprimir la renina, y debe estar en una dieta de bajo contenido de sal por 4 días.

Otro procedimiento de tamizaje es el renograma con captopril, que provee una medida indirecta de la velocidad de filtración glomerular y es dependiente de la angiotensina II. En



esta prueba se mide la incorporación de ácido dietilentriaminopentaacético por el riñón de (DPTA) o yodohipurato sódico(Hippuran) radiomarcado antes y después de la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) con captopril. Un resultado anormal indica que la estenosis es funcionalmente significativa y va a responder a la revascularización. En algunos centros de diagnóstico esta prueba ha reemplazado la evaluación de la renina de la vena renal. El estudio farmacológico con inhibidores de la ECA es otra prueba de evaluación sensible, pero no altamente específica, para pacientes sospechosos de tener hipertensión vascular renal. La administración de inhibidores de la ECA (esto es captopril) normalmente lleva a aumento de la actividad de la renina y a una caída de la presión sanguínea. Esta respuesta es exagerada en pacientes con hipertensión renal vascular. El problema son los resultados falsos positivos. El tratamiento inicial de elección es la angioplastia de la estenosis de la arteria renal. Esto funciona mejor en pacientes jóvenes con displasia fibromuscular. Si la angioplastia no es exitosa o si se produce una reestenosis, el procedimiento de angioplastia se puede repetir. Si éste falla, se puede recurrir a la revascularización quirúrgica.

Terapia con Agentes Farmacológicos

Aunque la terapia médica está más allá del enfoque de este capítulo, vale la pena resumir brevemente las principales clases de fármacos usados en el tratamiento inicial de la hipertensión, en especial aquel dirigido a las complicaciones metabólicas que pueden resultar de su uso. Algunos pacientes recibirán varias de estos fármacos.

En los últimos años ha habido un cambio gradual en el uso de diuréticos y beta bloqueadores hacia el uso de inhibidores de ECA y bloqueadores de los canales de calcio, por su baja incidencia de efectos colaterales en el control de la presión sanguínea. La efectividad de la terapia con drogas es mejor evaluada a través del monitoreo de la presión sanguínea y la historia del paciente.

Diuréticos.

Un grupo de aproximadamente 50 drogas llamadas diuréticos promueven la formación y excreción de orina con la intención de reducir la hipertensión y reducir el volumen del fluido extracelular. En grandes dosis pueden producir hipovolemia, desbalance electrolítico y falla prerrenal. Los diuréticos pueden también asociarse con una disfunción sexual en los hombres. Los efectos metabólicos laterales pueden incluir hipokalemia, hipomagnesemia, hiperuricemia, hiperglucemia, e hiperlipidemia. A pesar de estas desventajas, los diuréticos son efectivos y relativamente baratos, y muchos de sus efectos colaterales son mínimos, si el paciente es tratado y monitoreado debidamente.

Bloqueadores de los receptores beta adrenérgicos.

Las drogas que bloquean los receptores beta adrenérgicos disminuyen la frecuencia y fuerza de las contracciones cardíacas, entre otros efectos.

Si el paciente tiene diabetes mellitus, enfermedad crónica oclusiva periférica arterial, o enfermedad crónica obstructiva pulmonar, se deben usar beta bloqueadores cardiosselectivos. Sin embargo esto no elimina completamente las complicaciones en los pacientes mencionados.



Al igual que los diuréticos, los beta bloqueadores, pueden producir disfunción sexual y algunos trastornos metabólicos como algunos desequilibrios en la tolerancia a la glucosa o disminución del colesterol de las lipoproteínas de alta densidad y aumento del colesterol total sérico y triglicéridos.

Inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA).

Los inhibidores de la ECA bloquean la conversión de la angiotensina I en angiotensina II, que es un estimulante de la secreción de aldosterona y un potente vasoconstrictor. Se ha encontrado que este grupo de fármacos tiene una baja incidencia de efectos colaterales. Los inhibidores de la ECA no causan ninguna disfunción sexual en hombres, ni afectan adversamente los lípidos, glucosa, o ácido úrico, aunque tienden a aumentar el potasio.

Los inhibidores de la ECA reducen la proteinuria en pacientes con nefropatía diabética y pueden retardar la glomeruloesclerosis por dilatación selectiva de la arteriola eferente reduciendo la presión glomerular capilar sin comprometer el flujo sanguíneo. Los inhibidores de la ECA pueden causar insuficiencia renal aguda en pacientes con estenosis renal severa y grandes dosis pueden causar síndrome nefrótico, nefritis, y leucopenia.

Antagonistas del calcio.

Los antagonistas del calcio son potentes vasodilatadores periféricos y reducen la presión sanguínea al disminuir la resistencia periférica. El verapamilo tiene un efecto directo en el miocardio. Los antagonistas del calcio no tienen efectos metabólicos colaterales adversos pero son tan costosos como los inhibidores de la ECA.

Bibliografía

General

- Baxter J, Tyrell JB: The adrenal cortex. In Felig P et al, editors: *Endocrinology and metabolism*, ed 2, New York, 1987, McGraw-Hill.
- Besser GM, Cudworth AG, editors: *Clinical endocrinology: an illustrated text*, Philadelphia, 1987, Lippincott.
- Howanitz PJ, Howanitz JH: Hormones. In Howanitz PJ, Howanitz JH, editors: *Laboratory medicine*, New York, 1991, Churchill Livingstone.
- Orth DN, Kovacs WJ, DeBold CR: The adrenal cortex. In Wilson JD, Foster DW, editors: *Williams' textbook of endocrinology*, ed 8, Philadelphia, 1992, Saunders.
- Williams GH, Dluhy RG: Diseases of the adrenal cortex. In Wilson JD et al, editors: *Harrison's principles of internal medicine*, ed 12, New York, 1991, McGraw-Hill.

Mineralocorticoides

- Bravo EL, Tarazi RC, Dustan HP, et al: The changing clinical spectrum of primary aldosteronism, *Am J Med* 74:64-651, 1983.
- Lyons DF, Kem DC, Brown RD, et al: Single dose captopril as a diagnostic test for primary aldosteronism, *J Clin Endocrinol Metab* 57:892-896, 1983.
- Melby J: Diagnosis of hyperaldosteronism, *Endocrinol Metab Clin North Am* 20(2):247-255, 1991.
- Scully RE, Marj EJ, McNeely WF, McNeely BV: Case records of the Massachusetts General Hospital, *N Engl J Med* 326:1617-1623, 1992.



Short F, James VHT: Primary hyperaldosteronism in England and Wales: a review of the use of a supraregional assay service laboratory for the measurement of aldosterone and plasma renin activity, *Ann Clin Biochem* 28:218-225, 1991.

Steigerwalt SP: Unraveling the causes of hypertension and hypokalemia, *Hosp Pract* 30(7):67-79, 1995.

Ulick S: Two uncommon causes of mineralocorticoid excess, *Endocrinol Metab Clin North Am* 20(2):269-276, 1991.

Glucocorticoides

Baxter JD: The effects of glucocorticoid therapy, *Hosp Pract (Off Ed)* 27(9):111-114, 115-118, 123, passim, 1992.

Chrousos GP: The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation, *N Engl J Med* 332:1351-1362, 1995.

Findling J: Cushing's syndrome -an etiological work-up, *Hosp Pract* 27(10):107-122, 1992.

Freeman DA: Steroid hormone-producing tumors of the adrenal, ovary and testes, *Endocrinol Metab Clin North Am* 20(4):751-766, 1991.

Godl PW, Loriaux DL, Roy A, et al: Responses to CRH in hypercortisolism of depression and Cushing's disease, *N Engl J Med* 314:1329-1335, 1986.

Grua JR, Nelson DH: ACTH producing pituitary tumors, *Endocrinol Metab Clin North Am* 20(2):319-362, 1991.

Hermus AR, Pesmon GJ, Benraad TJ, et al: The CRH test versus the high-dose dexamethasone test in the differential diagnosis of Cushing's syndrome, *Lancet* 2:540-544, 1986.

Kaye TB, Crapo L: The Cushing syndrome: an update on diagnostic tests, *Ann Intern Med* 112:434-444, 1990.

Lacroix A, Bolte D, Tremblay J: Gastric inhibitory polypeptide\Ndependent cortisol hypersecretion, a new cause of Cushing's syndrome, *N Engl J Med* 327:914-980, 1992.

Loriaux DL: The treatment of Cushing's syndrome and adrenal cancer, *Endocrinol Metab Clin North Am* 20(4):767-771, 1991.

Loriaux DL, Nieman L: Corticotrophin-releasing hormone testing in pituitary disease, *Endocrinol Metab Clin North Am* 29(2):363-369, 1991.

Oldfield EH, Doppman JL, Lynette KN, et al: Petrosal sinus sampling with and without corticotrophin-releasing hormone for the differential diagnosis of Cushing's syndrome, *N Engl J Med* 325:897-905, 1991.

Orth DN: Differential diagnosis of Cushing's syndrome, *N Engl J Med* 325:957-959, 1991.

Andrógenos adrenales

Parker LN: Control of adrenal androgen secretion, *Endocrinol Metab Clin North Am* 29(2):401-421, 1991.

Meikle WA, Dagnes RA, Aranco BA: Adrenal androgen secretion and biologic effects, *Endocrinol Metab Clin North Am* 29(2):381-400, 1991.

Catecolaminas

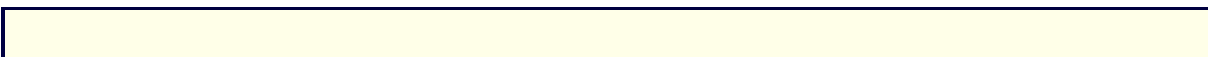
Bravo EL, Tarazi RC, Fouad RM, et al: Clonidine-suppression test: a useful aid in the diagnosis of pheochromocytoma, *N Engl J Med* 305:623, 1981.

Bravo EL, Tarazi RC: Plasma catecholamines in clinical investigation: a useful index or a meaningless number? *J Lab Clin Med* 100:155-162, 1982.

Bravo EL, Gifford RW: Pheochromocytoma: diagnosis, localization and management, *N Engl J Med* 311:1298-1303, 1984.

Cryer PE: Diagnosis of the sympathochromaffin system. In Felig P et al, editors: *Endocrinology and metabolism*, ed 2, New York, 1987, McGraw-Hill.

Landsberg L, Young JB: Pheochromocytoma. In Wilson JD et al, editors: *Harrison's principles of internal*



medicine, ed 12, New York, 1991, McGraw-Hill.

Landsberg L, Young JB: Catecholamines and the adrenal medulla. In Wilson JD, Foster DW, editors: *William's textbook of endocrinology*, ed 8, Philadelphia, 1992, Saunders.

Ross GA, Newbould EC, Thomas J, et al: Plasma and 24-hour urinary catecholamine concentrations in normal and patient populations, *Ann Clin Biochem* 3990:38-44, 1993.

Shepps SG, Jiang N, Klee GC: Diagnostic evaluation of pheochromocytoma, *Endocrinol Metab Clin North Am* 17(2):397-414, 1988.

Shepps SG, Jiang N, Klee GC, Heerden JA: Recent developments in the diagnosis and treatment of pheochromocytoma, *Mayo Clin Proc* 65:88-95, 1991.

Smythe GA, Edwards G, Graham P, Lazarus L: Biochemical diagnosis of pheochromocytoma by simultaneous measurement of urinary excretion of epinephrine and norepinephrine, *Clin Chem* 38:486-492, 1992.

Stenström G, Sjögren B, Waldenström J: Excretion of adrenalin, noradrenaline, vanilmandelic acid and metanephrines in 64 patients with pheochromocytoma, *Acta Med Scand* 214:145-152, 1983.

Hipertensión

Harvey JM, Beevers DG: Biochemical investigation of hypertension, *Ann Clin Biochem* 27:287-296, 1990.

Mahrensmith RL: Hypertension. In Abuelo JG, editor: *Renal pathophysiology -the essentials*, Baltimore, 1989, Williams & Wilkins.

Oparil S: Arterial hypertension. In Wyngaarden JB et al, editors: *Cecil textbook of medicine*, ed 19, Philadelphia, 1992, Saunders.

Williams GH: Hypertensive vascular disease. In Wilson JD, et al, editors: *Harrison's principles of internal medicine*, ed 12, New York, 1991, McGraw-Hill.

The 1988 report on the Joint National Committee on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure, *Arch Intern Med* 148:1023-1038, 1988.

Misceláneos

Migeon CJ, Donohue PA: Congenital adrenal hyperplasia caused by 21-hydroxylase deficiency, *Endocrinol Metab Clin North Am* 29(2):277-206, 1991.

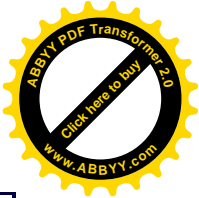
Miller WL: Congenital adrenal hyperplasias, *Endocrinol Metab Clin North Am* 20(4):721-749, 1991.

Moser HW, Bergin A, Naida S, Ladenson PW: Adrenoleukodystrophy, *Endocrinol Metab Clin North Am* 29(2):297-318, 1991.

Tablas

Tabla 46-1. Parte 1. Alteraciones de los compuestos analizados en estado de enfermedad

Enfermedad	Cortisol libre de 24 horas	17- OHCS	ACTH plasmática	Aldosterona urinaria
<i>Enfermedad hipercortical</i>				



Síndrome de Cushing (primario)	↑	↑	↓	
Síndrome de Cushing (secundario)	↑	↑	±	
ACTH ectópica	↑	↑	↑	
Hiperaldosteronismo primario				↑
Hiperaldosteronismo secundario				↑
Enfermedad hipocortical				
Primaria	±	↓	↑	
Secundaria	±	↓	↓	
Feocromocitoma				
↑Elevado; ±, respuesta variable; ↓, disminuido. ACTH, Hormona adrenocorticotrópica; 17-OHCS, 17- hidroxicoolesterol				

Tabla 46-1 Parte 2. Alteraciones de los compuestos analizados en estado de enfermedad

Enfermedad	Aldosterona plasmática	Cortisol plasmático	Actividad de renina plasmática	Catecolaminas en orina o plasma	Acido vanillil-mandélico y metanefrina urinarios
Enfermedad hipercortical					



Síndrome de Cushing (primario)		±	
Síndrome de Cushing (secundario)		±	
ACTH ectópica		±	
Hiperaldosteronismo primario	↑		↓
Hiperaldosteronismo secundario	↑		↑
Enfermedad hipocortical			
Primaria		↓	
Secundaria		↓	
Feocromocitoma			↑ ↑
↑Elevado; ±, respuesta variable; ↓, disminuido. ACTH, Hormona adrenocorticotrópica; 17-OHCS, 17- hidroxicoolesterol			

Tabla 46-2. Clasificación clínica de la presión sanguínea.

Presión sanguínea (mm Hg)		Categoría
Diastólica	< 85	Normal
	85-89	Normal alto
	90-104	Hipertensión leve
	105-104	Hipertensión moderada
	≥ 115	Hipertensión severa
Sistólica (Diastólica <90)	< 140	Normal
	140-159	Hipertensión sistólica sobre el límite aislada

> 160 Hipertensión sistólica aislada

Tabla 46-3. Factores que regulan la presión sanguínea.

Factor	Sitio de síntesis	Mecanismo y sitios de acción
Activadores barorreflejos arteriales		
Epinefrina	Médula adrenal	Vasodilatación de las arteriolas del músculo esquelético; vasoconstricción de arteriolas de la piel, mucosas, membranas y vísceras; aumento en la velocidad y fuerza de la contracción cardíaca
Norepinefrina	Terminales del Sistema Nervioso Simpático	Vasoconstricción general
Reguladores del volumen del fluido corporal		
Hormona antidiurética (HAD)	Neurohipófisis	Promueve la reabsorción de agua; aumenta el volumen plasmático
Aldosterona	Corteza adrenal	Reabsorción tubular renal de sodio; aumenta el volumen plasmático
Renina	Células yuxtaglomerulares del riñón	Convierten el angiotensinógeno en angiotensina I
Enzima convertidora	Pulmón	Convierte la angiotensina I en angiotensina II (potente vasoconstrictor, estimula la producción de aldosterona)
Autorregulación vascular	Específica de tejidos y órganos	Mecanismos locales para mantener una constante perfusión a los tejidos

Tabla 46-4. Principales causas de la hipertensión.

Causa	Incidencia relativa (%)
I Hipertensión primaria	90-95
II Enfermedad renal	4-5
III Hipertensión renovascular	2-5
IV Hipertensión inducida por drogas o agentes exógenos	< 2
Anticonceptivos orales	
Aminas simpaticomiméticas (descongestivos)	
Regaliz	

	Corticoides en alta dosis	
V	Endocrina	< 2
	Síndrome de Conn	
	Síndrome de Cushing	
	Feocromocitoma	
	Hiperparatiroidismo primario	
	Hipotiroidismo	
	Acromegalia	
	Hiperplasia adrenal congénita (deficiencia de 17-hidroxilasa y 11-hidroxilasa)	
VI	Coartación de la aorta	< 1

Figuras

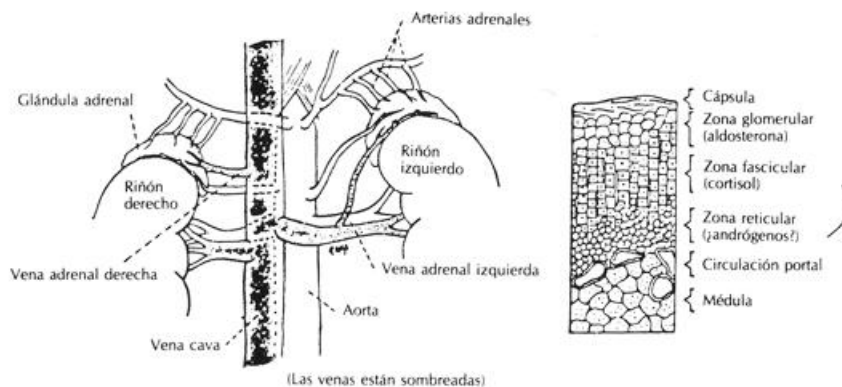
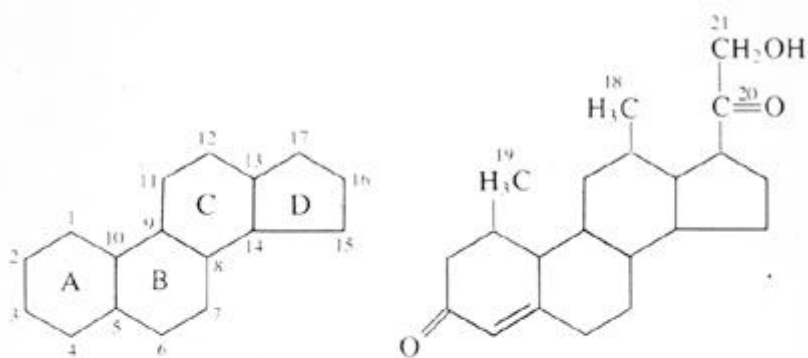
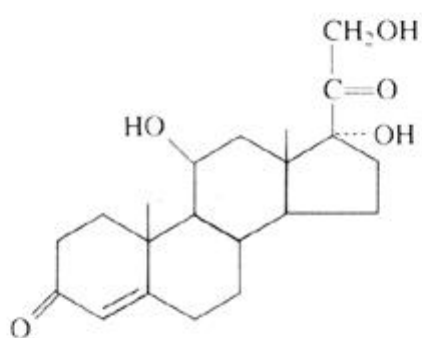


Figura 46-1 Anatomía e histología de la glándula adrenal. (De: Rayn W: *Endocrine disorders*, St. Louis, 1980, Mosby.)

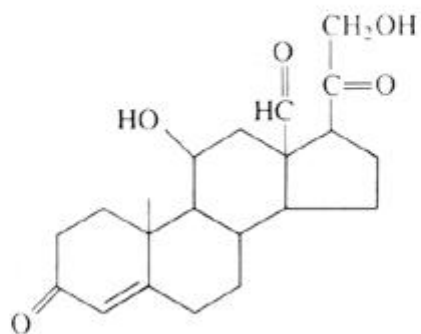


Núcleo esteroide básico

Núcleo corticosteroide



Cortisol



Aldosterona

Figura 46-2 Estructura de las hormonas adrenocorticales.

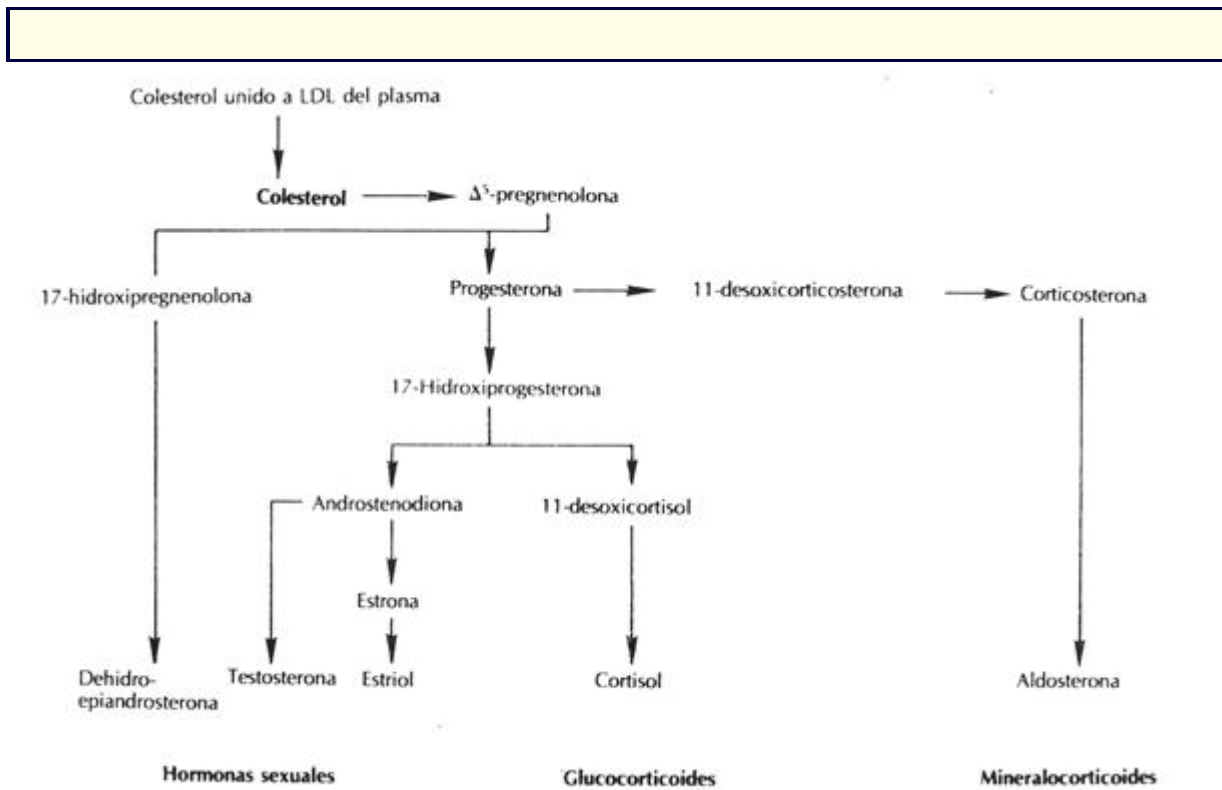


Figura 46-3 Principales vías de la esteroidogénesis adrenal. Las letras representan las diferentes enzimas responsables de la catálisis de cada transformación bioquímica. Nótese que la misma enzima puede ser responsable de más de un tipo de reacción. *A*, Citocromo mitocondrial P-450_{scc}, cataliza la ruptura de la cadena lateral de colesterol. *B*, 3β- hidroxiesteroide deshidrogenasa unida al retículo endoplásmico, también cataliza la actividad de la D⁵-D⁴ isomerasa. *C*, P-450_{c17}, es responsable de la actividad de la 17-hidroxilasa y la actividad de la 17,-20-liasa, la cual rompe la cadena lateral remanente en la posición C-17. *D*, p-450_{c21}, cataliza la 21-hidroxilación de la progesterona y la 17-hidroxiprogesterona. *E*, P-450_{c11} mitocondrial, cataliza 3 reacciones diferentes: 11-hidroxilación, 18-hidroxilación, y 18-metiloxidasa. *F*, 17-cetoesteroide reductasa, se encuentra principalmente en los testículos y ovarios. *G*, P-450_{aro} controla la aromatización del anillo A y se localiza principalmente en los ovarios.

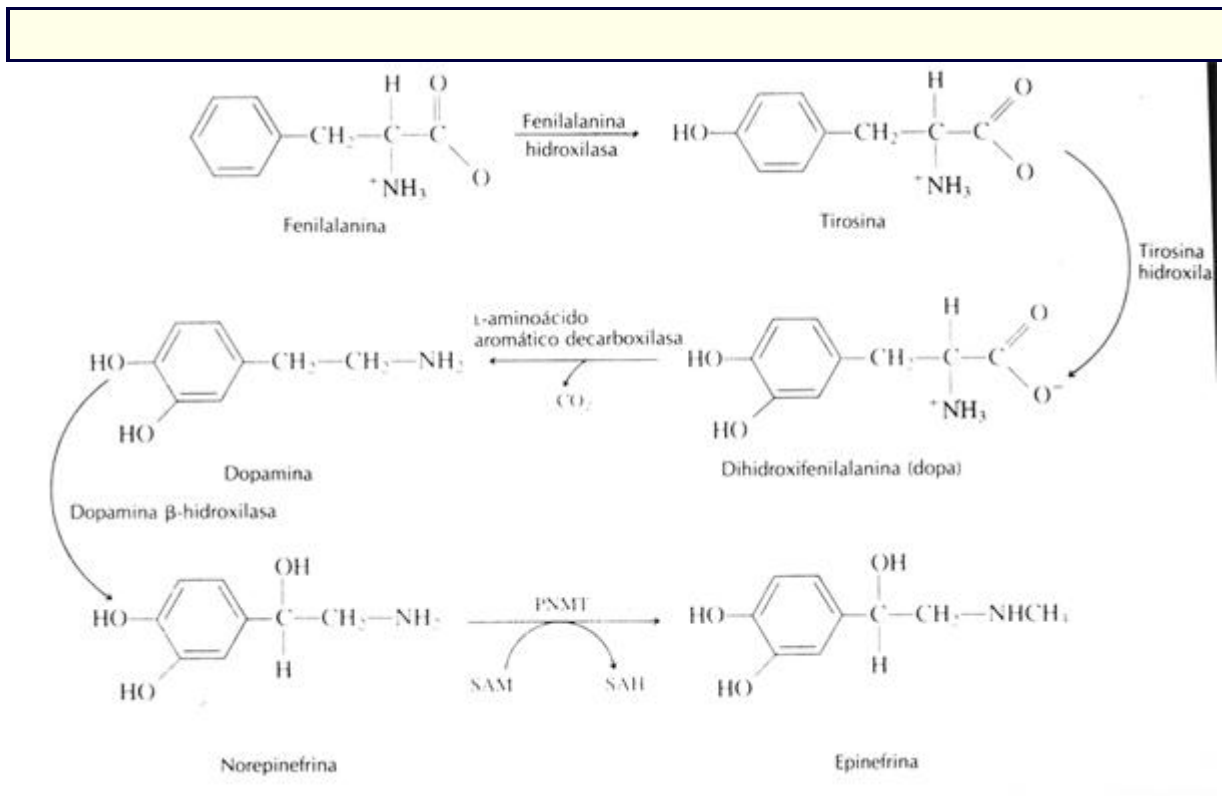


Figura 46-4 Síntesis de hormonas medulares. *PNMT*, feniletanolamina N.metil-transferasa; *SA*, S-adenosil homocisteína; *SAM*, S-adenosilmetionina. (De: Orten JM, Neuhaus OW: *Human biochemistry*, St. Louis, 1982, Mosby)

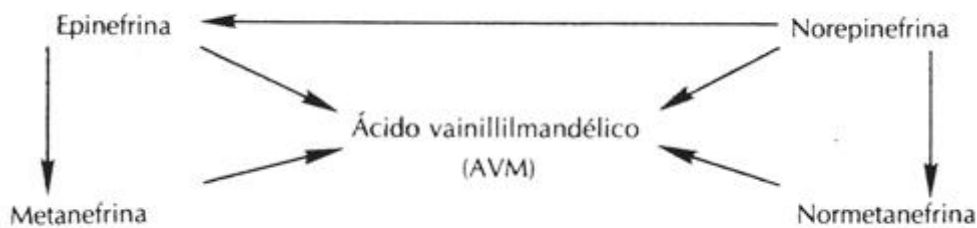


Figura 46-5 Metabolismo de las hormonas medulares (ver el texto para la descripción de las abreviaciones).

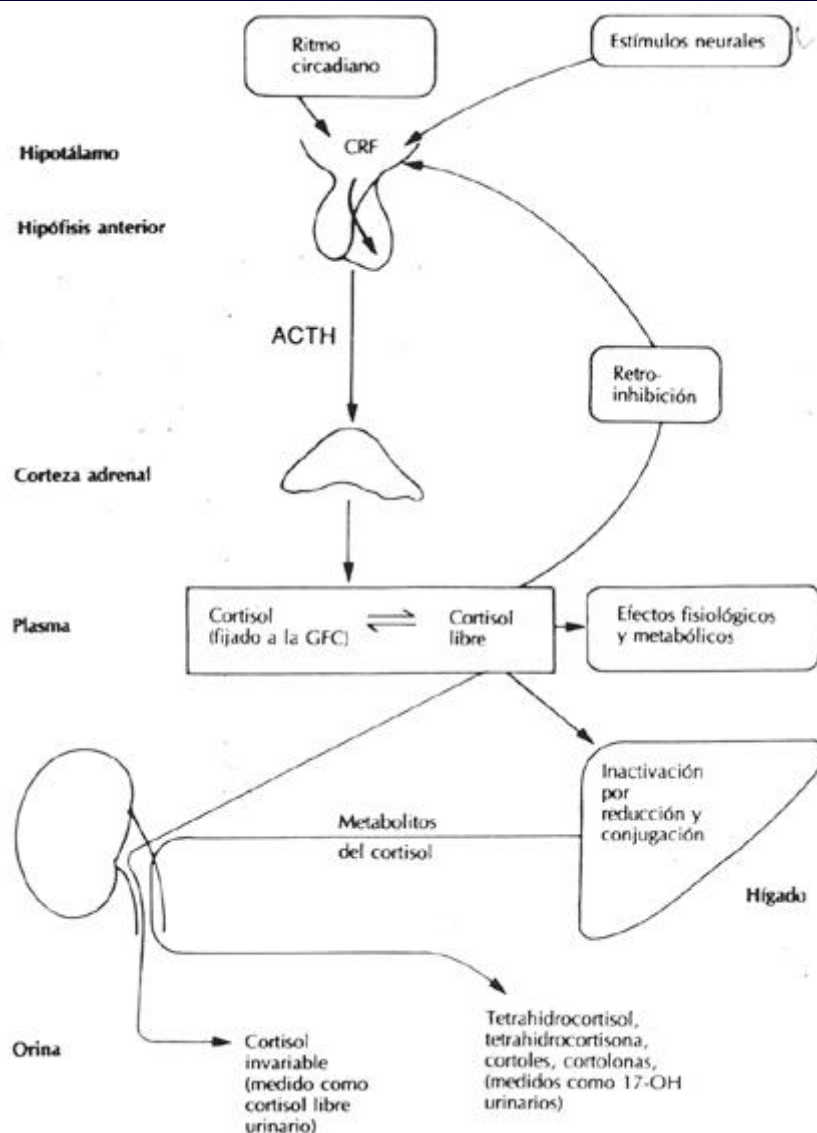


Figura 46-6 Control y metabolismo de los glucocorticoides. (De: Toft A: *Diagnosis and management of endocrine diseases*, St. Louis, 1981, Blackwell Scientific Publications.)

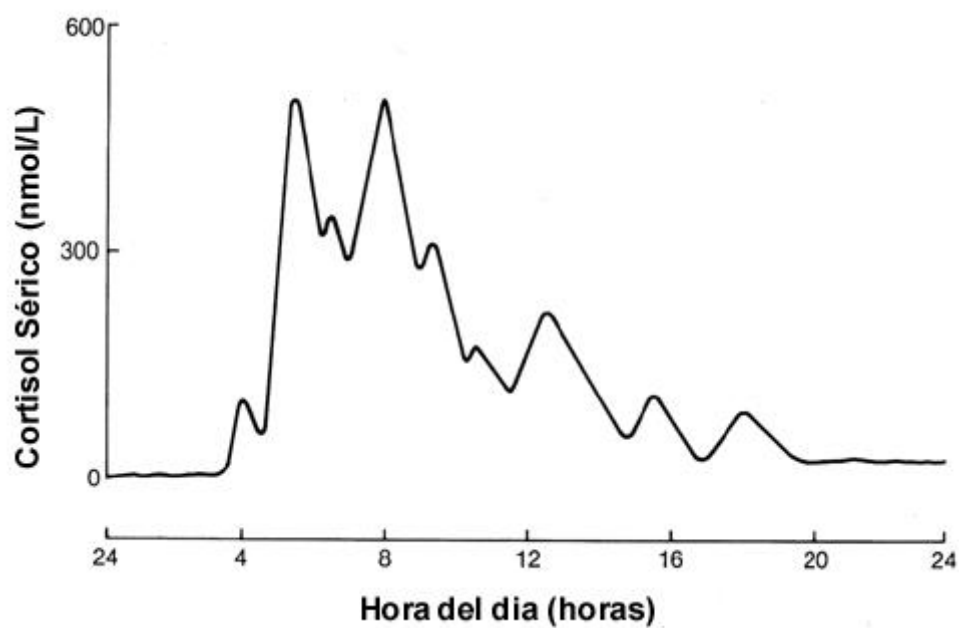


Figura 46-7 Variación de la concentración de cortisol sérico durante un período de 24 horas en un individuo sano.

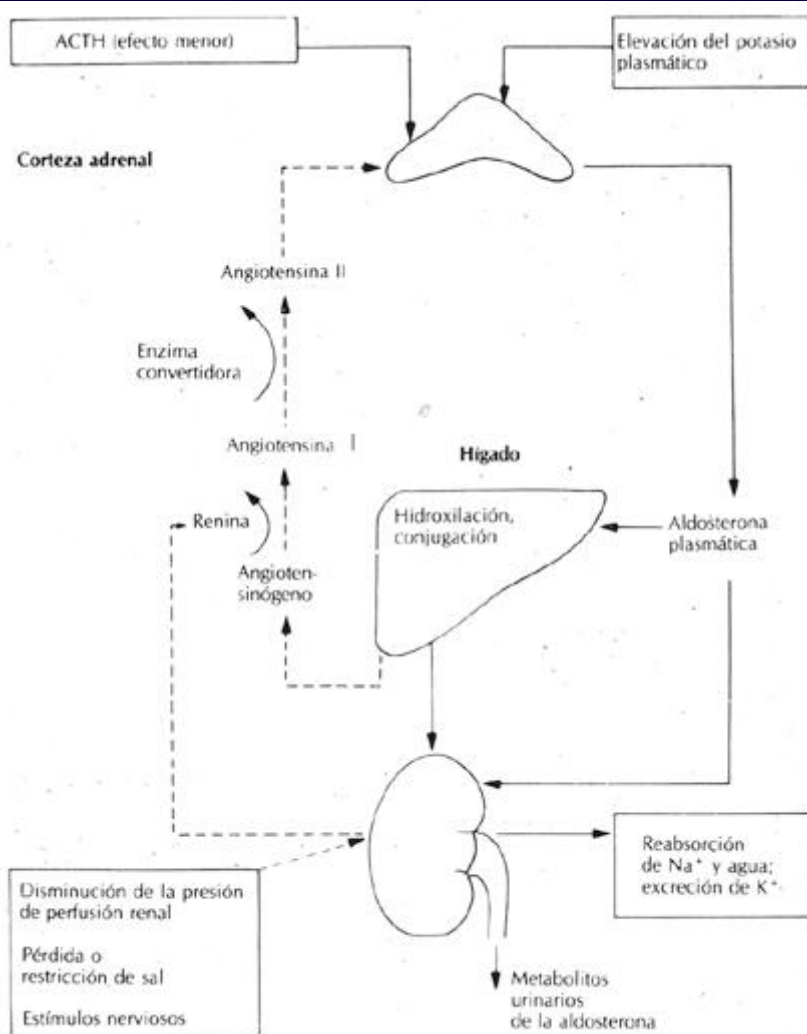


Figura 46-8 Control y metabolismo de la aldosterona. (De: Toft A: *Diagnosis and management of endocrine diseases*, St. Louis, 1981, Blackwell Scientific Publications.)

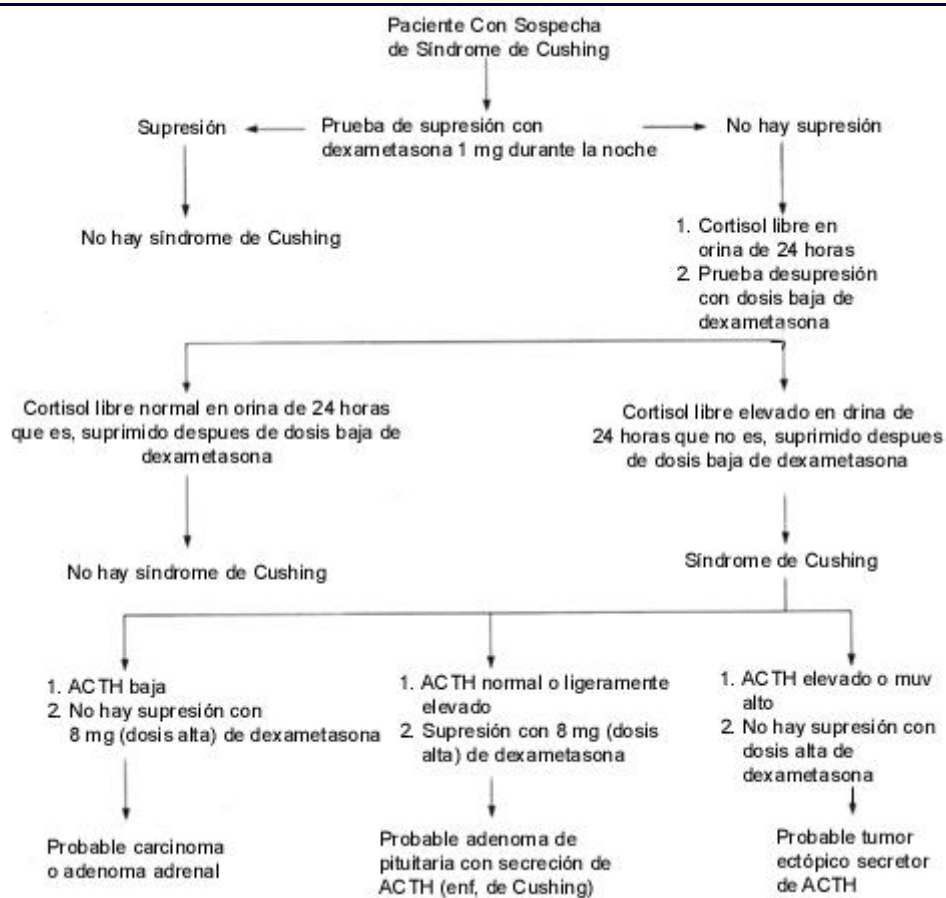


Figura 46-9 Protocolo de laboratorio para la investigación del Síndrome de Cushing.

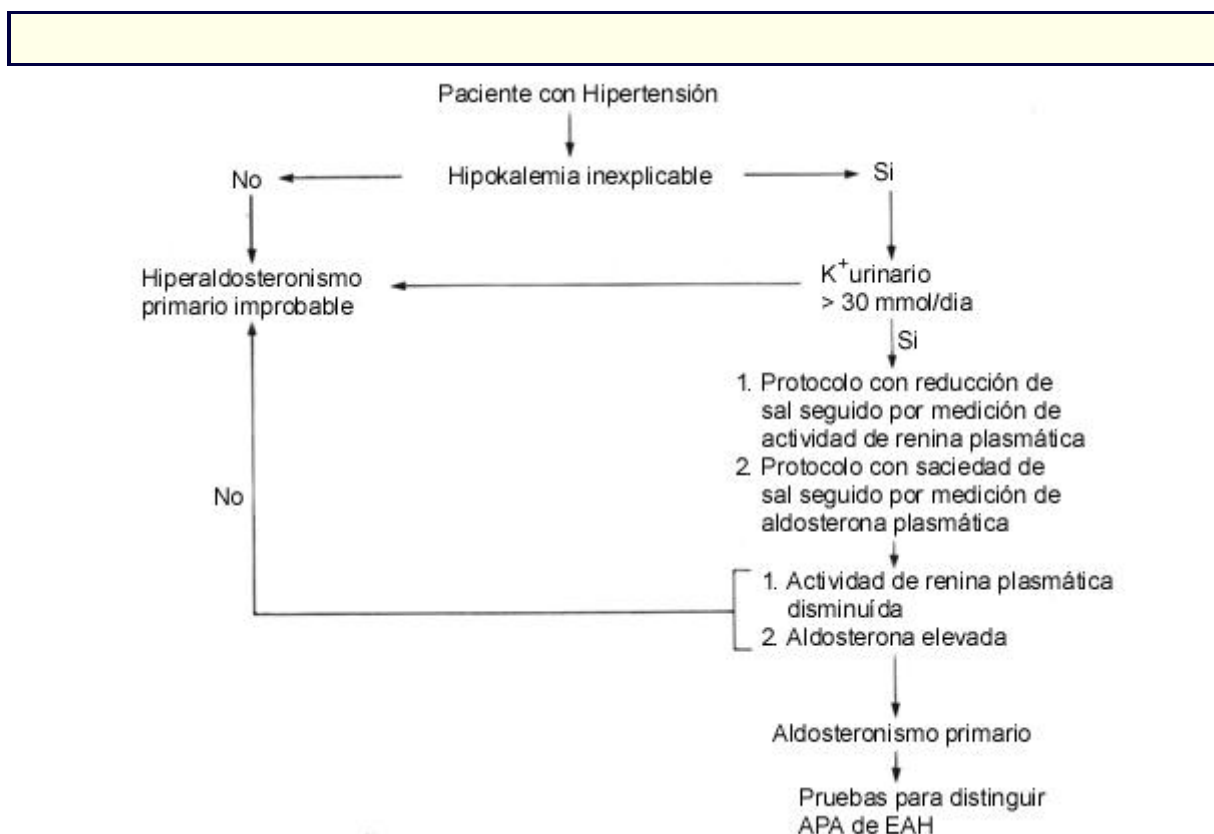


Figura 46-10 Protocolo de laboratorio para la investigación de un paciente con sospecha de hiperaldosteronismo primario (síndrome de Conn). Puede ser usado un enfoque alternativo (ver el texto).

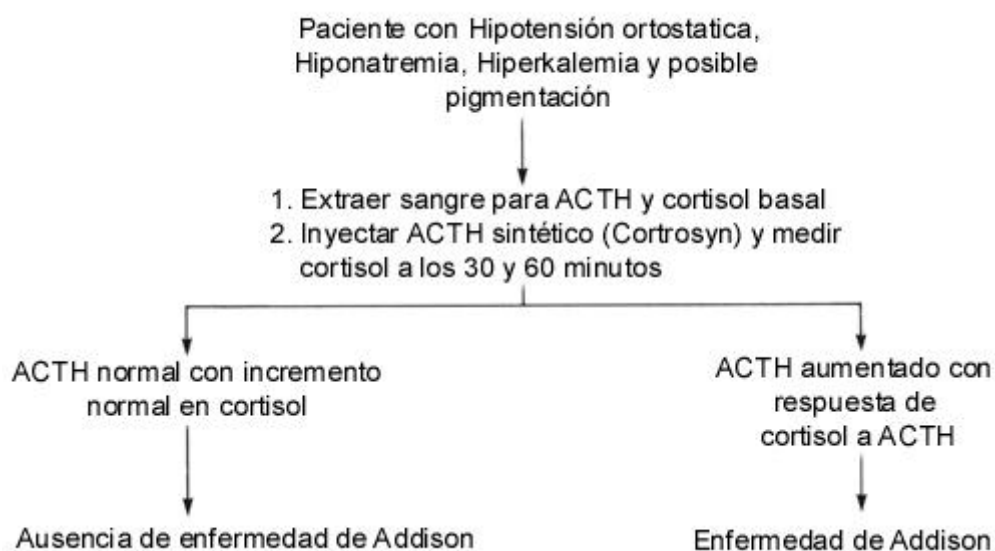




Figura 46-11 Protocolo de laboratorio para la investigación de la enfermedad de Addison.

CAPÍTULO 47

47. Enfermedades de Origen Genético

Thaddeus E. Kelly

Revisado por Donald L. Rucknagel

Base Genética de la Herencia

Base Química

Patrones hereditarios de genes únicos

Desórdenes patológicos asociados con cromosomas anormales

Aneuploidía

Anormalidades estructurales de los cromosomas

Métodos citogenéticos

Marcadores cromosómicos de enfermedad

Desórdenes patológicos asociados con cambios bioquímicos

Enfermedades de almacenamiento lisosomal

Participación del sistema reticuloendotelial

Desórdenes del metabolismo intermediario

Predominio del SNC

Tejido conectivo y predominio esquelético

Desórdenes del metabolismo intermediario

Acidurias orgánicas

Defectos en el metabolismo de los carbohidratos

Tamizaje genético

Papel del tamizaje en masa

Detección de los portadores heterocigotos

Diagnóstico prenatal

Pruebas de la alfa-fetoproteína

Tamizaje de la alfa-fetoproteína en el suero materno

Determinación de la alfa-fetoproteína del fluido amniótico

Métodos de Análisis

Antitripsina alfa-1

Tamizaje de carbohidratos

Ceruloplasmina

Colinesterasa



OBJETIVOS

- Describir brevemente la anomalía cromosómica asociada con los siguientes desórdenes patológicos: síndrome de Down, síndrome de Turner, síndrome de Klinefelter, leucemia mielógena crónica, anemia Fanconi, y síndrome de X frágil.
- Describir brevemente el desorden metabólico en cada una de las siguientes enfermedades y establecer los resultados químicos y clínicos anormales primarios:
 - Enfermedad de Gaucher
 - Enfermedad de Niemann-Pick
 - Enfermedad de Tay-Sachs
 - Síndrome de Hurler
 - Fenilcetonuria
 - Enfermedad urinaria de miel de maple
 - Galactosemia
 - Síndrome de Fanconi
 - Enfermedad de von Gierke
 - Raquitismo resistente a Vitamina D
 - Enfermedad de Wilson
 - Hipercolesterolemia familiar
 - Síndrome de Lesch-Nyhan
 - Atrofia óptica de Leber y miopatías causadas por mutaciones mitocondriales
 - Síndrome cerebrohepatorrenal de Zellweger
- Describir el papel del tamizaje genético en el diagnóstico de la enfermedad genética

Términos clave

alelo Una de las varias formas de un gen que puede aparecer en un locus específico

amniocentesis Una aspiración transabdominal del útero por medio de jeringa para obtener líquido amniótico.

aneuploidía Anomalía cromosómica causada por la adición o la ausencia de un cromosoma entero.

RNA heteronuclear Producto de transcripción inicial del RNA de un gen que contiene tanto las secuencias codificadoras (exones) como las no codificadoras (intrones).

autosómico Referente a cualquiera de los 22 cromosomas excepto los cromosomas X e Y.

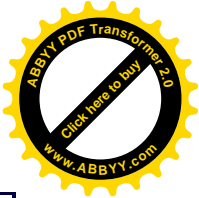
cariotipo La característica cromosómica de una célula nucleada.

clonas génicas Colonias de bacterias derivadas de una sola bacteria progenitora que contiene plásmidos, dentro de los cuales ha sido introducidos un gen o un fragmento de DNA humano.

cromosoma Estructura nuclear que contiene una organización lineal de genes. Los humanos poseen 23 pares de cromosomas.

corpúsculo de Barr Condensación del material nuclear (genético) del cromosoma X inactivado.

diploide Representación duplicada de cada gen y cromosoma



dismorfogénesis Defectos físicos causados por desarrollo embrionario alterado intrínsecamente.

endonucleasa de restricción Enzimas que escinden al DNA en donde existen secuencias específicas de cuatro a nueve pares de bases.

enfermedad de Tay-Sachs Forma infantil de un trastorno hereditario recesivo causado por un defecto en el metabolismo de lípidos en el que los esfingolípidos se acumulan en el cerebro, resultando en una degeneración mental y física progresiva. La enfermedad ocurre primariamente en los niños de ascendencia judía.

exón Porción de un gen que codifica la secuencia de aminoácidos de una proteína

fenilcetonuria Desorden hereditario autosómico recesivo causado por un defecto en la conversión de la fenilalanina en tirosina debido a la deficiencia de la fenilalanina hidroxilasa.

galactosemia Síndrome de toxicidad asociado con la intolerancia a la galactosa de la dieta y caracterizado por deficiencia de la enzima galactosa-1-fosfato uridil transferasa.

gen La unidad biológica más pequeña de la herencia, localizada en sitios específicos de cromosomas específicos. Un gen contiene la codificación para una proteína específica.

haplotipo Los alelos de genes ligados que aporta cualquiera de los padres biológicos

heterocigoto Referente a un estado en el cual un par de alelos son distintos en ambas posiciones de un mismo locus.

heteroplásmico Referente a la presencia de mitocondrias tanto normales como anormales en las células.

homocigoto Referente a un estado en el cual un par de alelos son los mismos en ambas posiciones de un mismo locus.

intrón (secuencia interventora) Secuencia compuesta de unos pocos o varios miles de pares de bases interpuestas en genes estructurales.

ligado a X Referente a un rasgo llevado en el cromosoma X.

lionización Proceso de inactivación al azar de un cromosoma X para compensar la doble contribución génica de los dos cromosomas X en las hembras.

locus Localización particular de un cromosoma dado ocupado por un gen estructural.

meiosis Segregación de genes y cromosomas con reducción de un número diploide a un haploide en la formación del espermatozoides y del huevo.

mitógeno Sustancia química que induce a dividirse a las células en cultivo

monosomía Ausencia de un cromosoma de una célula diploide diferente. El único desorden conocido es la ausencia del cromosoma Y o X en el síndrome de Turner.

promotor Secuencia pequeña de DNA en la terminación 5' de los genes estructurales; la unión de proteínas específicas a los promotores regula la transcripción del gen estructural.

rasgo Característica observable de un organismo que es visualmente aparente o como consecuencia de un análisis de laboratorio.

rasgo dominante Rasgo que se expresa o determina por la presencia heterocigota de un alelo en el locus del cromosoma.

rasgo recesivo Expresión de un rasgo que requiere que estén mutados ambos alelos en un locus.

reacción en cadena de la polimerasa Método analítico en donde la replicación repetida de una secuencia de restricción de DNA o RNA es mediada in vitro por la DNA polimerasa o



por la transcriptasa reversa resultando en una amplificación extremadamente alta de la región de interés.

síndrome de Down Condición caracterizada por retardo mental y anormalidades físicas causadas por trisomía del cromosoma 21.

síndrome de Lechs-Nyhan Error raro del metabolismo de las purinas ligado a X, caracterizado por retardo mental y automutilación. Existe una deficiencia de la enzima hipoxantinguanina fosforribosil transferasa.

síndrome de Turner Condición que consiste de una función ausente del ovario, tamaño pequeño y anomalías físicas; es causado principalmente por un cariotipo 45,X.

prueba de Guthrie Ensayo microbiológico para la fenilalanina del suero; usado para la detección de la fenilcetonuria.

translocación Término usado en genética para describir el desplazamiento de una porción de un cromosoma en la estructura de otro.

trisomía Presencia de un cromosoma adicional de un par específico en una célula diploide diferente ($2n + 1$ cromosomas). Ver *síndrome de Down*.

Bases Genética de la Herencia

En la década de 1860, después de una serie de experimentos simples, Gregorio Mendel propuso dos leyes que explicaban la transmisión de los rasgos de las generaciones cruzadas. En la primera ley, Mendel estableció que la segregación de los factores determinantes de un rasgo seguía patrones predecibles y que se podía anticipar qué proporción de la descendencia expresa varias formas de un rasgo dado. La segunda ley, la ley de la distribución independiente, establecía que la herencia de un rasgo no tenía efectos en la herencia de un segundo rasgo. Aproximadamente cuarenta años más tarde, con la posibilidad de observar la división celular bajo el microscopio, fue reconocido que el comportamiento de los cromosomas durante la división celular era consistente con las predicciones realizadas por Mendel en lo que respecta a la segregación de los rasgos. Ahora reconocemos que los factores descritos por Mendel son los genes y que éstos son transportados por los cromosomas cuya segregación puede observarse en la división celular.

Se ha visto que numerosas enfermedades hereditarias son causadas por la anomalía estructural de una proteína que es el producto de un gen defectuoso. Actualmente, los genes responsables de la mayoría de las enfermedades hereditarias han sido clonados y su DNA secuenciado, algunos sin que la proteína involucrada haya sido primeramente identificada. Lo que sigue a continuación no es una revisión extensa, sino que, más bien, utiliza ejemplos específicos para ilustrar el estado actual de nuestro conocimiento sobre las enfermedades hereditarias.

Base Química

Los genes están compuestos de DNA y, ocasionalmente (en los virus), de RNA. El DNA y el RNA están compuestos de secuencias nucleotídicas. Un código de tres pares bases de ácido nucleico codifica la secuencia de los aminoácidos en las cadenas polipeptídicas. Un gen podría definirse como la cantidad de DNA equivalente a una cadena polipeptídica. Los genes eucariotes son más complejos sin embargo, que los genes de las bacterias o virus, y



contienen bloques de nucleótidos, compuestos de varios cientos hasta miles de pares de bases, insertos en la secuencia codificadora. Estas secuencias insertadas, llamadas secuencias interventoras o intrones, se transcriben a lo largo de las secuencias codificadoras para formar RNA heteronuclear (hnRNA) en el núcleo de la célula. Para convertir al hnRNA a RNA mensajero, el hnRNA debe ser procesado, para lo cual se aplica una tapa en el extremo 5', los transcritos del intrón (secuencias no codificadoras) son removidos del hnRNA y una cola de poliadenilato es ligada a la terminación 3'. El RNA resultante, el RNA mensajero, sirve como un molde para la síntesis de la cadena polipeptídica. Los genes de los organismos superiores ocupan localizaciones específicas en los cromosomas y codifican polipéptidos que poseen funciones fisiológicas específicas. Cada polipéptido puede funcionar como una sola proteína o combinarse con otros polipéptidos para formar una unidad heteropolimérica funcional. Sin embargo, permanece la premisa básica de que un gen estructural codifica una sola cadena polipeptídica con una función específica (Fig. 47-1). Un cambio en la secuencia de DNA de un exón de un gen estructural, una mutación, resultará en un polipeptido estructuralmente alterado.

La mayor parte de los cambios mutacionales son sustituciones en un único par de bases que producen sustituciones en un solo aminoácido de la proteína o cadena polipeptídica resultantes. Dependiendo de su localización en la molécula, una sustitución de aminoácidos puede afectar profundamente la función o puede silenciarse. Otros cambios mutacionales que han sido documentados son las inserciones o deleciones de bloques de DNA, las *mutaciones del marco de lectura*, causadas por inserciones o deleciones de múltiplos de uno o dos pares de bases, la formación de codones sin sentido de terminaciones de cadena, y por sustituciones de bases que interfieren con el proceso del RNA heteronuclear para producir inserciones o deleciones complejas en la secuencia de los aminoácidos del producto génico. Finalmente, algunos cambios mutacionales interfieren con las secuencias reguladoras del DNA en cualquier lugar de un gen que altere la velocidad a la cual ordinariamente se transcriben las secuencias génicas normales. El prototipo para tales cambios es la mutación de la β -talasemia de los loci en la cadena β de la hemoglobina. El tipo de enfermedad que resulta a partir de una mutación depende de la función del polipéptido. Los ejemplos están ilustrados en la Tabla 47-1. Los métodos específicos empleados para detectar mutaciones se discuten más abajo (pág. 945) y más profundamente en el capítulo 48.

El material genético de las células humanas es diploide en el sentido de que cada gen está representado dos veces, uno para cada par ocupando una localización específica, o un locus, en cada par de cromosomas similares u homólogos. Los cromosomas se segregan durante la meiosis, reduciéndose el número de cromosomas de un número diploide a uno haploide. Los humanos tienen un número cromosómico o modal de 46 en las células somáticas y de 23 en los gametos. Virtualmente cada locus génico estructural tiene una serie de alelos que puede existir. En la mayoría de los casos estos alelos fueron creados por mutaciones que consisten de un cambio en un único nucleótido en la estructura del gen y por lo tanto en la sustitución de un único aminoácido en el producto génico. La mayoría de estos productos génicos son igualmente funcionales pero pueden reconocerse por las diferentes propiedades electroforéticas e inmunológicas del producto génico. En el brazo largo del cromosoma 1 se encuentra el locus para el grupo sanguíneo Duffy. En dicho locus, pueden tener lugar varias formas alternativas del gen o de los alelos, dando lugar a diferentes tipos sanguíneos Duffy.

Los dos alelos más comunes del locus del grupo sanguíneo Duffy se designan a y b (es decir, Fya y Fyb respectivamente). Los productos génicos para los alelos a y b del grupo sanguíneo Duffy se reconocen por las técnicas estándar de tipificación sanguínea. Cuando el par de alelos de un locus dado son los mismos, se dice que la persona es homocigota para ese locus. Así, una persona con el alelo **a** en ambas posiciones del par del cromosoma 1 para el grupo sanguíneo Duffy es homocigoto **a**. Cuando el par de alelos son diferentes, como los alelos Duffy **a** y **b**, la persona es un heterocigoto.

Una serie de mutaciones alélicas puede impartir un rango de consecuencias funcionales en el producto génico polipeptídico. Por ejemplo, muchas mutaciones diferentes tienen lugar en el gen estructural para la cadena β de la hemoglobina. Esta serie de alelos resulta en cambios funcionales en las cadenas de la β -hemoglobina que varían desde insignificantes, ausencia de enfermedad, hasta falta del producto génico y enfermedad severa, la β -talasemia.

Patrones genéticos simples de la herencia

Los cromosomas en los pares numerados del 1 al 22 se llaman autosómicos, y los cromosomas en el par remanente son llamados cromosomas sexuales (X e Y). Cuando un rasgo es determinado por la presencia de un alelo mutante en el locus de un autosoma, el rasgo es heredado como un rasgo dominante autosómico. Una persona que muestra ese rasgo puede ser tanto homocigoto (dos alelos mutantes) como heterocigoto (un alelo mutante) para dicho rasgo. Cuando la expresión del rasgo requiere que ambos genes contengan el mismo alelo mutante, se dice que el rasgo es un rasgo autosómico recesivo. Los términos dominante y recesivo se refieren al rasgo en cuestión y no a los genes determinantes del rasgo. El hecho de que el rasgo pueda ser clasificado como dominante o recesivo puede depender de una definición de lo que constituye la presencia de la enfermedad. Por ejemplo, si se estudian familias con un gen para una célula falciforme solamente por detección de la morfología falciforme, la enfermedad sería clasificada como heredada dominantemente porque solamente un gen sería suficiente para provocar el rasgo. Sí, por otro lado, se usa solamente la medida de la concentración de hemoglobina total, la enfermedad es clasificada como un desorden autosómico recesivo porque los heterocigotos y los homocigotos para el alelo normal no podrían distinguirse. Cuando se utiliza la electroforesis, los tres genótipos son definibles, y el rasgo se clasifica como heredado codominantemente. Un padre puede transmitir un desorden autosómico dominante a su descendencia ya que un desorden dominante se determina por la presencia de un solo alelo, pero un desorden hereditario autosómico recesivo requiere de la herencia de alelos mutantes provenientes de ambos padres. Puede verse a partir de la Fig. 47-2 que se puede heredar el estado transportador para la enfermedad de célula falciforme a partir de un solo progenitor, pero que la enfermedad en sí puede heredarse a partir de ambos padres. En general, los desórdenes que se caracterizan por un metabolismo bioquímico alterado y que son diagnosticables a través de medios bioquímicos, son condiciones hereditarias autosómicas recesivas.

Los dos cromosomas sexuales del hombre consisten de un cromosoma X y de un cromosoma Y. La mujer tiene dos cromosomas X. La enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6-PD) es codificada por un gen en el cromosoma X. Debido a que una mujer posee dos cromosomas X y un hombre posee un cromosoma X, debería esperarse que

una mujer fabricara dos veces la cantidad de G-6-PD que fabrica el hombre. En promedio, sin embargo, las mujeres y los hombres producen iguales cantidades de G-6-PD. Existe compensación de la dosis génica que ocurre por un mecanismo de *lionización*, o inactivación al azar del cromosoma X. Durante los comienzos del desarrollo embrionario del 46.XX femenino, uno de los dos cromosomas X es inactivado al azar; ya no produce más productos génicos. Debido a que esto es un proceso al azar, cada mujer es una mezcla o mosaico de células en las cuales uno u otro, pero no ambos, de los cromosomas X está funcionando (Fig. 47-3). La presencia de un cromosoma Y se encuentra asociado con la masculinidad, y su ausencia está asociada con la femineidad. El cromosoma Y transporta un factor, llamado el *factor determinante de testículo* (FDT), que induce a la gónada embrionaria a desarrollar un testículo, en su ausencia la gónada se desarrolla como un ovario. No existen otros genes, residiendo en el cromosoma Y que se haya mostrado que codifican proteínas. El cromosoma X acarrea muchos genes estructurales y codifica proteínas similares a aquellas codificadas por los autosomas.

La diferencia en la constitución del cromosoma sexual de los hombres y las mujeres es la base del patrón particular de herencia conocido como *ligado a X*. Si hay una mutación en el único cromosoma X de un hombre, éste transmitirá siempre dicho gen mutante a todas sus hijas y a ninguno de sus hijos. Una mujer heterocigota puede dar a una hija o a un hijo cualquiera de sus cromosomas X, uno de los cuales tiene el gen normal y el otro posee el gen mutante. Si la mutación en el cromosoma X resulta en una enfermedad cuando se encuentra presente el estado heterocigoto en la mujer, el rasgo se conoce como un desorden dominante ligado a X, y se observará tanto en hombres como en mujeres. Debido a que el único gen X del hombre es portador de una mutación, la enfermedad generalmente es más severa en el hombre que en la mujer ya que esta última tiene un gen mutante y un gen normal. Si la mutación no se expresa como un rasgo reconocible en el estado heterocigoto de la mujer, el desorden es recesivamente hereditario ligado al X. Los hombres manifestarán el desorden y las mujeres portarán pero no manifestarán el gen del desorden. Las mujeres son portadoras de la hemofilia y de la distrofia muscular Duchenne, pero la enfermedad ocurre en los hombres, quienes poseen una única copia del gen mutante. Hay pruebas que identificarán a la mujer portadora para la mayor parte de las enfermedades recesivas ligadas a X. En general estas pruebas demuestran una expresión parcial en las mujeres del defecto visto en los hombres afectados.

Muchos rasgos tales como la altura y la inteligencia y defectos aislados de nacimiento como el labio leporino y la enfermedad congénita del corazón se determinan por la acción conjunta de muchos genes y el ambiente. Este modo de herencia se llama *causalidad multifactorial*. Tales rasgos son familiares y tienen una importancia genética mayor pero no se segregan en las familias de una manera similar a las vistas para los rasgos autosómicos dominantes y recesivos. Un rasgo expresado es la consecuencia de numerosos genes recibidos de cada padre y una influencia ambiental variable que determina la expresión del rasgo. Además de los defectos del nacimiento aislados observados en los niños, la causalidad multifactorial es responsable de muchas enfermedades comunes en los adultos. Los ejemplos incluyen la diabetes mellitus insulino dependiente, la osteoartritis, la gota y ciertas formas de hipertensión, y de enfermedad de las arterias coronarias.



Desórdenes Patológicos Asociados con Cromosomas Anormales

Aneuploidía

Los desórdenes que ocurren como resultado de una anomalía cromosómica involucran más bien un cambio en la dosificación génica para un gran número de genes que un cambio en la estructura del gen. Esto produce un cambio en patrón original del desarrollo estructural del embrión. Dicha anomalía puede aparecer de dos maneras. Primero, existe la presencia o ausencia de un cromosoma entero, una aneuploidía. Esto se encuentra simplificado por la presencia de un cromosoma 21 extra en la trisomía 21, que causa el síndrome de Down, y por la presencia de un único cromosoma X que resulta en monosomía, que ocurre en el síndrome de Turner. La trisomía implica la presencia de tres copias de un cromosoma más que los dos normales, y monosomía significa la presencia de una única copia. Segundo, existen alteraciones estructurales en los cromosomas que resultan en la pérdida o la adición parcial pero no del cromosoma entero. Una variedad de anomalías estructurales de los cromosomas puede conducir a dicha desviación de la cantidad normal del material cromosómico.

Las anomalías cromosómicas que involucran los autosomas, ya sea que involucren una pérdida parcial o completa o un agregado de un cromosoma, siempre resulta en morfogénesis alterada, expresada como defectos de nacimiento mayores o menores, y en desarrollo mental alterado en la forma de retardo mental. El desarrollo físico alterado en un embrión cromosómicamente anormal se llama dismorfogénesis; las anomalías físicas se llaman características dismórficas. En el síndrome de Down, esto consiste de rasgos tales como orejas pequeñas, pliegues inusuales en las palmas, sesgos ascensionales de los ojos, tamaño pequeño de la cabeza, enfermedad cardíaca congénita, y estatura pequeña.

El síndrome de Down es una combinación fácilmente reconocible de anomalías físicas mayores y menores asociadas con el retardo mental. Ocurre como resultado específico de la presencia de una triple dosis del material del cromosoma 21. Esto ocurre más comúnmente como trisomía 21, la presencia de tres cromosomas 21 separados como resultado de la no-dislocación meiótica. La meiosis es una forma especial de división celular que tiene lugar en las células germinales que producen el huevo o la esperma. Esta división reduce el número de cromosomas de 46 a 23, con la representación de un miembro de cada par de cromosomas. La no-dislocación es la falla consistente en que uno de los cromosomas del par no se va a una de las células hija durante la división; en su lugar ambos van a una sola la célula hija (Fig. 47-4). La frecuencia de la no dislocación aumenta con la edad materna. Por esta razón, se recomienda para las mujeres de 35 años de edad o más, el diagnóstico prenatal mediante la amniocentesis con estudio citogenético. Esta forma de síndrome de Down no ocurre con una incidencia familiar aumentada.

Anormalidades estructurales de los cromosomas

Una forma familiar del síndrome de Down ocurre con una anomalía estructural conocida como una *translocación Robertsoniana*. Esta translocación se forma por la fusión de los centrómeros, más comúnmente de los cromosomas 14 y 21. Un portador de una translocación 14/21 tendrá un número cromosómico de 45. Sin embargo, el cromosoma de translocación contiene la cantidad normal de material cromosómico de los dos cromosomas



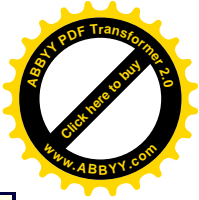
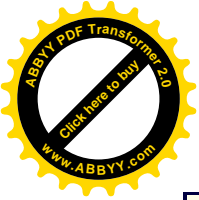
separados y el portador es fenotípicamente normal. La meiosis en un portador de translocación puede resultar en una variedad de gametos diferentes. Entre la descendencia de portadores de una translocación 14/21, se puede observar infantes normales con 46 cromosomas normales, e infantes con 46 cromosomas de los cuales hay dos cromosomas 21 normales y el material de un tercer 21 presente en la translocación (Figura 47-5). Dichos niños poseen el típico síndrome de Down. La translocación puede ocurrir en múltiples miembros de una familia, cada uno de los cuales es un portador de un riesgo creciente de tener un niño con síndrome de Down. Se pueden diferenciar las formas familiares y esporádicas del síndrome de Down mediante estudios cromosómicos. Por esa razón, es aconsejable que a cada persona con síndrome de Down le sea realizado un análisis cromosómico para determinar si existe un riesgo creciente para otros miembros de la familia de tener niños con síndrome de Down.

Anormalidades cromosómicas sexuales

Las alteraciones en el número de cromosomas sexuales no son comunes, y pueden ocurrir varios tipos de aneuploidía. Estas condiciones fueron reconocidas originalmente a través del uso de frotis bucales para el análisis del corpúsculo de Barr. Cada cromosoma en exceso de 1 en el núcleo celular es inactivado y entonces se observa como el corpúsculo de Barr. El corpúsculo de Barr, nombrado por su descubridor, es la condensación nuclear del cromosoma X inactivado y aparece como un agrupamiento dentro y adyacente a la membrana nuclear (Fig. 47-6). Las células de un hombre normal contienen solamente un cromosoma X; de esta manera, el corpúsculo de Barr no se encuentra presente. Las células de una mujer normal contienen dos cromosomas X y demuestran la existencia de un solo cuerpo de Barr.

Las anomalías de los cromosomas sexuales en las mujeres ocurren más comúnmente como un cariotipo 45,X y 47,XXX. El primero es el hallazgo cromosómico más común en el síndrome de Turner. Este desorden presenta tres características importantes: estatura baja, anomalías dismórficas menores, y malformaciones congénitas e infantilismo sexual. El infantilismo sexual tiene lugar como resultado de fibrosis de un ovario infantil, y de esta forma en el momento de la pubertad ni los folículos ni las células productoras de hormonas se encuentran presentes. En su forma clásica este síndrome se diagnostica por frotis bucal, el cual mostrará la ausencia de corpúsculos Barr. Sin embargo, una variedad de anomalías del cromosoma X puede dar lugar al síndrome de Turner; por esa razón debe realizarse un cariotipo linfocitario completo a independientemente de los hallazgos del frotis bucal. El cariotipo 47,XXX no se encuentra asociado con anomalías clínicas significativas.

Las anomalías más comunes de los cromosomas sexuales en los hombres incluyen los cariotipos 47,XXY y 47,XYY. El síndrome de Klinefelter (47,XXY) presenta tres hallazgos clínicos principales: anomalías de menores hasta no dismórficas, retardo de normal a moderado en la función cognoscitiva, y falla del desarrollo testicular con infantilismo sexual secundario y un hábito de cuerpo enuicoide. Debido a la falta de producción de testosterona a la edad de la pubertad, estos varones pueden responder a los estrógenos ováricos con agrandamiento del pecho o de ginecomasia. La corrección quirúrgica de la ginecomasia y la terapia de reemplazo de testosterona corregirá la mayoría de los problemas asociados con este desorden. Existe considerable controversia con relación al tipo y a la



frecuencia de las manifestaciones clínicas asociadas con el cariotipo 47,XYY. Los varones con el cariotipo 47,XYY son física y sexualmente normales, pero algunos estudios han sugerido que una gran proporción de los hombres con este cariotipo muestra comportamiento sociopático.

Métodos citogenéticos

El método más común de análisis cromosómico involucra el cultivo de linfocitos periféricos. Estos son células maduras circulantes en la sangre periférica que no experimentan activamente división celular. Dichas células pueden ser estimuladas para dividirse mediante la adición de un mitógeno al medio de cultivo. El mitógeno que más se utiliza en citogenética humana es la fitohemaglutinina (FHA). Los linfocitos son cultivados en presencia de FHA comúnmente durante 72 horas. Hacia el final del período de cultivo, se agrega la colchicina al cultivo. Este agente actúa como un veneno microtubular desorganizando el huso mitótico durante la división celular. De esta manera las células pueden ser fijadas en la metafase, el único momento durante la división celular en que los cromosomas pueden ser fácilmente visualizados y estudiados (Fig. 47-7). Al final del período de cultivo las células pueden ser recolectadas, extendidas sobre un portaobjetos, y teñidas con un número de fluorógenos o cromógenos. Cuando se utilizan técnicas fijadoras especiales, los cromosomas toman una apariencia de banda. Estas bandas son específicas para cada cromosoma y permiten un análisis detallado de la estructura de cada cromosoma.

El cromosoma Y normal contiene un segmento fluorescente grande en el brazo largo. Si un frotis bucal de un hombre 46,XY se tiñe con un colorante fluorescente, será revelado un punto fluorescente luminoso llamado *cuerpo F* o *cuerpo Y*. El uso de la tinción de Giemsa para los corpúsculos de Barr y la coloración fluorescente para los cuerpos Y, permite una determinación de la constitución del cromosoma sexual a partir de un frotis bucal. El reconocimiento de ambos cuerpos el de Barr y el Y, es lo suficientemente subjetivo como para necesitar de un técnico experimentado para una determinación exacta, utilizando células control a partir de hombres y mujeres normales. En la Tabla 47-2 se muestran los hallazgos esperados de la determinación del corpúsculo de Barr y el cuerpo de Y a partir de un frotis bucal para analizar las constituciones cromosómicas sexuales normales y anormales.

Recientemente se han desarrollado técnicas para hibridizar RNA o DNA (ver capítulo 48) marcados con enzimas cromogénicas o fluorocromos en las preparaciones cromosómicas que han sido fijadas durante la metafase. El marcaje de las pruebas moleculares con diferentes fluorocromos coloreados permite definir anomalías cariotípicas complejas, incluyendo genes de copia única. Los genes de fusión hibridizados con sondas para los genes constitutivos marcados con fluorocromos de colores complementarios, aparecerán como un tercer color. El uso de marcadores fluorescentes en la hibridización in situ (denominada FISH) le ha conferido otra dimensión al análisis cariotípico.

Marcadores cromosómicos de enfermedad

El análisis de los cromosomas en las células en división puede revelar anomalías de tres tipos: primero, un cambio en la cantidad del material cromosómico presente, como en la aneuploidía o en la duplicación o delección parciales: segundo, no hay alteración en la cantidad



del material cromosómico, pero sí cambios cromosómicos que constituyen un diagnóstico de estados específicos de enfermedad; tercero, cambios no específicos en la estructura o en el número cromosómicos que reflejan las consecuencias de influencias ambientales, como los fármacos, radiación, o el comportamiento cromosómico anormal visto en las células malignas.

Las mejoras en las técnicas de cultivo y de tinción de los cromosomas han revelado que las células malignas a menudo demuestran una anormalidad cromosómica consistente y específica que es de ayuda importante en el diagnóstico. Dicha anormalidad se encuentra mejor ejemplificada por el cromosoma Filadelfia (Ph1) hallado en la mayoría de las personas con leucemia mielogénica crónica (LMC). El cromosoma Filadelfia representa una delección en el cromosoma 22, tornándolo en un pequeño cromosoma acrocéntrico (Fig. 47-8). El material suprimido se encuentra a menudo, en su mayor parte, translocado a un cromosoma 9. De esta manera, no hay pérdida o ganancia del material cromosómico, pero sí un rearrreglo cromosómico. El cromosoma de Filadelfia está confinado a las células malignas de la médula ósea, y el análisis del cromosoma de Filadelfia se realiza por aspiración de la médula ósea. Los puntos de ruptura de estos cromosomas han sido clonados en bacterias utilizando la tecnología del DNA recombinante. La translocación crea un gen de fusión, la porción 5' proveniente del oncogen c-Abelson que se encuentra presente generalmente en el brazo largo del cromosoma 9; el extremo 3' deriva de un gen situado en la región de la ruptura, sobre el cromosoma 22. La proteína de fusión resultante es una proteína cinasa truncada. La expresión clínica de la neoplasia maligna asociada correlaciona con la localización precisa de la translocación. Las translocaciones que acompañan a muchas neoplasias malignas en las que están involucradas oncogenes, inmunoglobulinas, y varios receptores celulares.

Un segundo tipo de marcador cromosómico utilizado para diagnóstico es el de la ruptura cromosómica. Este se encuentra más dramáticamente ilustrado en la anemia de Fanconi. Las personas con esta forma de anemia aplásica hereditaria autosómica recesiva, demuestran un aumento pronunciado en las frecuencias de las rupturas y discontinuidades cromosómicas espontáneas en los linfocitos periféricos cultivados. La anemia aplásica ocurre como resultado de la falla de la médula ósea para producir los glóbulos rojos. Los estudios de las células somáticas cultivadas a partir de personas con la anemia de Fanconi involucran cuatro mecanismos genéticos diferentes que se cree afectan las proteínas de reparación de DNA. De esta manera, se cree que las diversas características dismórficas son el resultado de mutaciones somáticas múltiples que resultan de la reparación defectuosa del DNA.

El desorden hereditario autosómico recesivo del síndrome de Bloom se caracteriza también por un aumento marcado en la frecuencia de los intercambios de cromátidas hermanas en los linfocitos cultivados. El síndrome de Bloom se caracteriza típicamente por el retardo en el crecimiento intrauterino y por la estatura baja ulterior. Tales pacientes presentan sensibilidad aumentada de la piel a los rayos ultravioletas y un riesgo significativo de neoplasias que incluyen la leucemia al final de la niñez y en las primeras etapas del adulto.

Un cuarto tipo de marcador cromosómico específico es el cromosoma X frágil, reconocido en una forma de retardo mental ligada a X. Los hallazgos característicos en este desorden incluyen agrandamiento de los testículos después de la pubertad, orejas grandes y simplemente formadas, una personalidad jovial, y retardo mental de moderado a severo. Aproximadamente el 10% de las mujeres portadoras de esta forma de retardo mental ligado a X muestran una forma moderada de retardo mental. El cultivo de linfocitos con medios de crecimiento estándar utilizados para estudios citogenéticos no demostrará el cromosoma X



frágil. Sin embargo, el uso de medios que son deficientes en ácido fólico mostrará un cromosoma X frágil en un porcentaje significativo de células obtenidas de un hombre afectado. La designación de X frágil es utilizada porque el cromosoma X en estos hombres parece tener una ruptura al final del brazo largo.

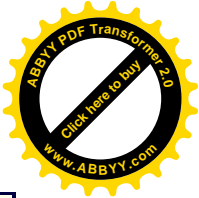
El modo de herencia del síndrome de X frágil presenta varias características inusuales. Las mujeres portadoras presentan solamente retardo mental moderado, nunca una alteración mental severa. En los hombres afectados, el defecto parece ser progresivamente más severo en las generaciones subsiguientes de la misma familia, y la edad del envejecimiento es progresivamente más temprana. El sitio frágil del X ya ha sido clonado, y se ha demostrado que existe un defecto en la amplificación del DNA. En la población normal, ha sido encontrada una secuencia altamente polimórfica de 5 a 54 repeticiones del triplete CGG entre la terminación 5' del cromosoma y el gen X frágil (denominado gen FMR-1). Los portadores de las familias afectadas poseen un número de tripletes anormalmente aumentado. El límite para la expresión clínica del defecto génico es de aproximadamente 80 tripletes. La descendencia de los individuos con más de 50 repeticiones se encuentra en gran peligro de llegar a tener grandes amplificaciones. Los individuos severamente afectados pueden tener hasta 400 copias en tandem de los tripletes CGG, siendo la severidad proporcional al número de repeticiones. El número de tripletes transmitidos por los hombres a sus hijas es estable. Durante una meiosis simple puede ocurrir una amplificación de varias veces en una portadora femenina. Aun cuando la proteína FMR-1 se expresa en el cerebro y en el testículo, su función aún se desconoce.

Defectos similares en la amplificación han sido encontrados en la atrofia espinal y muscular vulvar, o en la enfermedad de Kennedy, en la cual las 11 a 31 repeticiones normalmente presentes en el primer exón del gen para el receptor de andrógeno están representados por un segmento de poliglutamina en la proteína. En la distrofia miotónica normalmente se encuentran presentes de 5 a 30 copias de GCT en la región sin traducir entre el extremo 3' del cromosoma y el codón de terminación de un gen que conocido como gen de la proteína cinasa miotonina (MT-PC) en el cromosoma 19. La enfermedad de Huntington es causada también por amplificación alterada de las secuencias halladas entre la terminación 5' del cromosoma y el gen de Huntington en el cromosoma 7. En el capítulo 48 puede encontrarse información adicional sobre el efecto de la amplificación de las secuencias repetidas.

Desórdenes Patológicos Asociados con Cambios Bioquímicos

Enfermedades de almacenamiento lisosomal

Las enfermedades de almacenamiento lisosomal son trastornos recesivos hereditarios, cada uno de los cuales es el resultado la deficiencia de una hidrolasa ácida específica. Estas hidrolasas ácidas específicas están localizadas dentro de los organelos citoplásmicos unidos a la membrana denominados lisosomas. Si hay una deficiencia completa o casi completa de una hidrolasa específica, se acumulará dentro del tejido el compuesto macromolecular que normalmente se degrada. Los órganos primarios afectados dependerán de la distribución del compuesto macromolecular en el tejido. Estos órganos incluyen (1) el sistema retículoendotelial, (2) el sistema nervioso central (SNC), y (3) el esqueleto y los tejidos



conectivos y otros órganos somáticos. En un desorden determinado, las manifestaciones clínicas pueden ser aparentes en solamente uno o en cualquier combinación de estos tres sistemas de órganos. El cuadro siguiente establece un esquema de clasificación para las enfermedades de almacenamiento lisosomal.

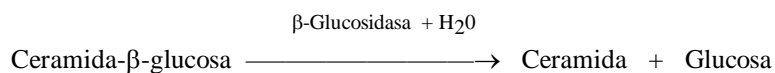
Grados variables de deficiencia o de actividad alterada de una hidrolasa pueden conducir a varios síndromes clínicos diferentes que ocurren como resultado de la misma deficiencia enzimática. Esto se demuestra por la deficiencia de la hidrolasa α -L-iduronidasa. La deficiencia de esta enzima produce la acumulación de glicosaminoglicanos, sulfato de dermatano y sulfato de heparano. En su forma más grave con el máximo grado de deficiencia enzimática, el síndrome de Hurler se presenta con graves manifestaciones esqueléticas, somáticas, y del sistema nervioso central, y finalmente con la muerte alrededor de los 5 a 8 años de edad. En su forma más moderada, la deficiencia de esta enzima resulta en el síndrome de Scheie con estatura, esperanza de vida e inteligencia normales, pero con anomalías esqueléticas, oculares y cardíacas. Una forma intermedia, en sus manifestaciones clínicas es conocida como el síndrome de Hurler-Scheie.

Clasificación de la Enfermedad por Almacenamiento Lisosomal	
Mucopolisacaridosis	
Mucopolisidosis (ML)	
ML I (actualmente llamada “salidosis”)	
ML II o enfermedad celular I	
ML III o polidistrofia pseudo-Hurler	
ML IV	
Gangliosidosis	
Gangliosidosis G _{M1} , o gangliosidosis generalizada	
Gangliosidosis G _{M2}	
Enfermedad de Tay-Sachs	
Enfermedad de Sandhoff	
Leucodistrofias	
Leucodistrofia metacromática	
Enfermedad de Krabbe	
Adrenoleucodistrofia	
Glicoproteinos	
Manosidosis	
Fucosidosis	
Sialidosis	
Aspartilglucosaminuria	
Otros	
Ceramidosis	
Enfermedad por almacenamiento de éster de colesterol	
Enfermedad de Pompe, o Enfermedad por almacenamiento de glucógeno, II	

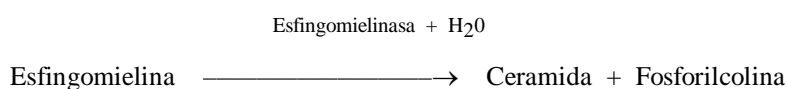
Participación del sistema retículo endotelial



Los dos desórdenes en los cuales es más prominente la participación del hígado y el bazo, y pueden representar la manifestación más importante son las enfermedades de Gaucher y de Niemann-Pick. La enfermedad de Gaucher ocurre como resultado de la deficiencia de la hidrolasa ácida β -glucosidasa:



La deficiencia de esta enzima lleva a la acumulación lisosomal del fosfolípido glucosilceramida. Este desorden ocurre en varias formas. La forma más severa es conocida como la enfermedad neuronopática de Gaucher (tipo 2), en la cual, aun cuando ocurre agrandamiento del hígado y del bazo, predomina la acumulación masiva de fosfolípidos dentro del sistema nervioso central y los niños afectados mueren durante el primer año de vida. El otro extremo es ilustrado por la forma adulta de la enfermedad de Gaucher (tipo 1), reconocida por hepatoesplenomegalia, en la cual ocurre una buena salud general y esperanza de vida. Anterior al uso de ensayos enzimáticos para los diagnósticos específicos, la enfermedad de Gaucher fue en su mayor parte reconocida por la demostración de las células de Gaucher (macrófagos grandes) en una aspiración de médula ósea. Debido a que ha sido clonado el gen para la ceramida glucosidasa, actualmente el diagnóstico es de una gran exactitud. La enfermedad de Gaucher prevalece en los judíos Ashkenazi. Una mutación en el nucleótido 1226 explica el 73% de los alelos mutantes (frecuencia génica, 0.035) en esta población. Los alelos adicionales explican una frecuencia del heterocigoto en el total de la población del 8.9% y una incidencia de la enfermedad al nacimiento de 1:450. La enzima, ceramida glucosidasa, actualmente se encuentra disponible comercialmente, aunque a un alto costo. El uso de esta enzima como un agente terapéutico puede permitir la movilización del gangliósido acumulado a partir del hueso y del hígado. Aún no es posible revertir la enfermedad neurológica. El segundo desorden en este grupo, la enfermedad de Niemann-Pick, ocurre también en varias formas que varían desde una enfermedad infantil severa hasta una enfermedad adulta moderada. Este trastorno ocurre como resultado de una deficiencia de esfingomielinasa.

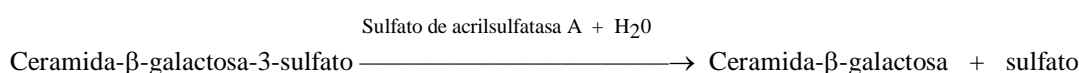


La enfermedad de Niemann-Pick también se asocia con el agrandamiento del hígado y del bazo. La enfermedad de Niemann-Pick puede ser diagnosticada a través de la demostración de las células de almacenamiento en la aspiración de la médula ósea que representan los macrófagos con lisosomas congestionados de esfingomielina. El gen de la esfingomielinasa ácida ha sido clonado y mapeado en el cromosoma 11p15; se han identificado numerosas mutaciones a nivel molecular.

Desórdenes del Metabolismo Intermediario

Predominio del SNC

Las enfermedades de almacenamiento lisosomal que afectan principalmente al SNC involucran clínicamente en un comienzo a la materia gris o a la materia blanca. Cuando la acumulación inicial ocurre dentro de la materia blanca, el desorden se conoce como leucodistrofia, y se observan anormalidades motoras al comienzo del curso de la enfermedad. La leucodistrofia más comúnmente reconocida es la leucodistrofia metacromática, en la cual el tejido neural demuestra una propiedad de tinción metacromática particular que resulta de la acumulación lisosómica de galactoceramida sulfatada. La enzima deficiente se llama arilsulfatasa A, o sulfatasa de sulfato de cerebrósido. Varias pruebas de tamizaje se encuentran disponibles para este desorden e incluyen el examen de orina para gránulos metacromáticos.



En la orina normal se encuentran presentes cantidades adecuadas de esta enzima por un simple ensayo colorimétrico de la actividad de la arilsulfatasa. La presencia de una cantidad adecuada de actividad de la enzima excluirá este diagnóstico, pero la falta de actividad de la enzima no es diagnóstica e indica que deben utilizarse sistemas de ensayos más específicos. El diagnóstico específico de leucodistrofia metacromática requiere la demostración de la deficiencia de arilsulfatasa A en los leucocitos periféricos homogeneizados o de fibroblastos cultivados de piel. La arilsulfatasa existe en dos formas lisosomales conocidas como A y B. El uso de la electroforesis de acetato de celulosa es un segundo método de diagnóstico. En la leucodistrofia metacromática se observa una banda de arilsulfatasa B, mientras que la banda A no se detecta.

La enfermedad de almacenamiento lisosomal más conocida que resulta en la acumulación de compuesto macromolecular dentro de la materia gris, es la enfermedad de Tay-Sachs. Este desorden ocurre como resultado de la acumulación del gangliósido Gm2 (Fig. 47-9) dentro del SNC. En la forma clásica resulta en una regresión temprana de la función del SNC, de tal manera que niños de 1 año de edad con esta enfermedad presentan desarrollo retardado del conocimiento, oído y vista deteriorados, y una mancha rojo frambuesa característica en el examen fundoscópico. La acumulación del gangliósido Gm2 en el SNC ocurre como resultado de la deficiencia de la hidrolasa ácida N-acetil- β -D-galactosaminidasa. Han sido definidas muchas variantes juveniles y de las formas adultas al inicio de la enfermedad, y a menudo aparecen en la fase final del inicio de la ataxia cerebral o convulsiones. La actividad de la N-acetil- β -D-galactosaminidasa es analizada con un sustrato artificial, ya sea una glucosamina o una galactosamina. Por lo tanto la actividad de la enzima medida de esta manera se basa en la hexosaminidasa. La hexosaminidasa existe en dos formas, una termolábil y otra termoestable. La forma termolábil está constituida de hexosaminidasa A, y un heteropolímero de las subunidades α y β , mientras que la forma termoestable está compuesta por la hexosaminidasa B y un homopolímero de subunidades β . La enfermedad de Tay-Sachs se caracteriza generalmente por la deficiencia específica de hexosaminidasa A. La enfermedad de Sandhoffs está asociada a numerosas mutaciones del gen b. La medición de la actividad enzimática, con y sin inactivación por calor, proporciona los niveles de hexosaminidasa B y de hexosaminidasa total respectivamente. La diferencia entre las dos



determinaciones es entonces el nivel calculado de hexosaminidasa A o forma termolábil. Una proteína llamada de activación ha sido encontrada como una pequeña proteína que forma un complejo con el gangliósido Gm2 haciéndola accesible a la hexosaminidasa. Las mutaciones del gen que codifica para esta proteína pueden alterar la actividad funcional de ambas enzimas, la A y la B, y también afectar a la enfermedad.

Debido a que la enfermedad de Tay-Sachs ocurre más comúnmente entre los niños judíos Ashkenazi, esta población objetivo puede ser rastreada para la detección del portador. La determinación del porcentaje de hexosaminidasa A presente como función de la actividad total de hexosaminidasa representa el método de tamizaje más exacto para la detección de los portadores de la enfermedad de Tay-Sachs. Es necesario de que cada laboratorio determine sus valores de referencia y los valores para los portadores de la enfermedad de Tay-Sachs. La confirmación del estado de portador requiere del estudio de la actividad de la hexosaminidasa A en los leucocitos periféricos y de estudios familiares adicionales si es necesario resolver resultados dudosos. El uso de dichas pruebas de portador entre los judíos Ashkenazi y la utilización subsiguiente del diagnóstico prenatal, ha reducido significativamente la incidencia de la enfermedad de Tay-Sachs en los Estados Unidos.

La aplicación de la tecnología del DNA recombinante al estudio de la enfermedad de Tay-Sachs ha expandido muchísimo el entendimiento de la heterogeneidad clínica de la enfermedad, el cual ha sido evidente. Los genes estructurales para las subunidades a y b de la hexosaminidasa y de las proteínas activadoras se encuentran en los cromosomas 15, 5 y 5 respectivamente. Del 3% de los judíos Ashkenazi que son heterocigotos para esta enfermedad, aproximadamente el 73% tiene una inserción de cuatro pares de bases nucleotídicas en el exón 11 para crear una mutación del marco de lectura; 15% presentan una sustitución de G a C en el primer nucleótido del intrón 12 para crear una anomalía de "splicing"; 4% tienen una sustitución de la glicina 269 por serina en la terminación 3' del exón 7, que es responsable del comienzo de la enfermedad en el adulto, y 8% presentan resultados falso positivos así como un grupo heterogéneo de otras mutaciones. La presencia de mutaciones múltiples, todas de origen Ashkenáico de Europa del este, sugiere algunas ventajas selectivas para la formación del heterocigoto más que un "efecto fundador" (pasando a mutaciones originales) como la explicación de la alta frecuencia. Ochenta por ciento de los heterocigotos no judíos presentan otras mutaciones.

Tejido conectivo y predominancia esquelética

Las enfermedades de almacenamiento lisosomal que involucran el tejido conectivo, especialmente el sistema esquelético, son referidas como los desórdenes de tipo Hurler. También junto con el sistema esquelético pueden estar involucrados el SNC o el reticuloendotelial. La Tabla 47-3 establece una clasificación de desórdenes lisosomales que son observados con este fenotipo.

El síndrome de Hurler representa al prototipo de las enfermedades que involucran el metabolismo de los glucosaminoglicanos y que causan un trastorno del tejido conectivo. Esta forma de deficiencia de la α -L-iduronidasa se caracteriza por involucrar un multisistema que es generalmente aparente alrededor de los 6 meses de edad (Fig. 47-10). Es seguido de un curso que progresa rápidamente de allí en adelante con todos los sistemas de órganos involucrados y un deterioro mental que predomina en la última etapa del desorden, y finalmente con la muerte



que ocurre de los 5 a los 8 años de edad. Estas enfermedades fueron clasificadas inicialmente sobre la base del patrón urinario de los mucopolisacáridos o de la excreción de glucosaminoglucano. En el síndrome de Hurler, se excretan cantidades masivas de sulfato de dermatano y sulfato de heparano en la orina. La mucopolisacariduria se detecta por una variedad de pruebas de tamizaje incluyendo una prueba de la mancha de orina, la prueba del azul de toluidina.

El reconocimiento del fenotipo clínico y de la presencia de una prueba positiva de tamizaje de orina es seguido por el estudio del metabolismo de los mucopolisacáridos en los fibroblastos cultivados y el ensayo de las hidrolasas específicas que pueden causar la mucopolisacaridosis. El sulfato inorgánico agregado al medio de cultivo de tejido está incorporado exclusivamente en los fibroblastos de cultivo como glucosaminoglicanos sulfatados. El uso de sulfato radiactivo permite el reconocimiento de la acumulación de estos compuestos sulfatados dentro de los fibroblastos cultivados y por lo tanto proporciona evidencia directa para la acumulación tisular de glucosaminoglicanos. Se puede buscar un diagnóstico específico mediante el ensayo de las hidrolasas individuales que, cuando están deficientes, dan origen a una mucopolisacaridosis. La Tabla 47-4 muestra el patrón de la polisacariduria y de la deficiencia de hidrolasa ácida específica en la mucopolisacaridosis.

Otro desorden que da lugar a un cuadro clínico de tipo Hurler es la *mucopolipidosis II*, o enfermedad celular I. Los niños con esta enfermedad son clínicamente similares a aquellos con el síndrome de Hurler pero son diagnosticados a una edad más temprana y siguen un curso más rápido de deterioro, ocurriendo la muerte entre los 3 y 5 años de edad. No hay mucopolisacariduria. Cuando los fibroblastos cultivados de piel obtenidos de niños afectados fueron analizados primeramente en el microscopio de fase, fue notado un marcado aumento en las inclusiones citoplásmicas, de ahí el nombre de *célula I*, o *enfermedad de inclusión celular*. Las hidrolasas lisosomales son glucoproteínas. Cada enzima lisosomal tiene un solo gen estructural que codifica para el componente proteico de la glucoproteína. Es común, sin embargo, la modificación postraducciona de estas proteínas para formar el componente oligosacárido de las glucoproteínas. Se ha reconocido que los azúcares de manosa-6-fosfato en la cadena de oligosacárido de la estructura de glucoproteína que constituyen las hidrolasas ácidas, son necesarios para su localización intracelular apropiada. Esto se logra a través de varios pasos enzimáticos postraduccionales en la modificación de la cadena de oligosacárido. La deficiencia de una transferasa involucrada en tales modificaciones postraduccionales representa el defecto molecular principal en la enfermedad celular I. Los fibroblastos cultivados de piel a partir de niños afectados muestran niveles de deficiencia de numerosas hidrolasas ácidas en las células cultivadas. El efecto último reside en la localización intracelular anormal de estas hidrolasas. La orina de los pacientes con la enfermedad celular I muestra niveles aumentados de hidrolasas lisosomales y un aumento en la cantidad de oligosacáridos del ácido siálico. La medición del ácido siálico unido en la orina es un procedimiento relativamente simple y representa una excelente prueba de tamizaje para un gran número de enfermedades de almacenamiento lisosomal.

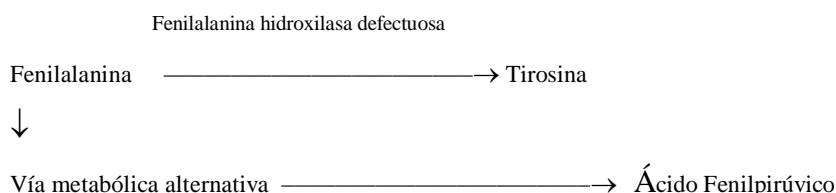
Desórdenes del metabolismo intermediario

Los desórdenes del metabolismo intermediario ocurren como resultado de tres mecanismos básicos: una deficiencia de enzima con conversión defectuosa de sustrato, un

defecto en el transporte de membrana resultando en una falla en la absorción o en excreción excesiva de un compuesto, y en defectos en los receptores involucrados en la mediación del metabolismo. La base bioquímica de la enfermedad originada tiene lugar como resultado de (1) acumulación de un sustrato hasta niveles que se vuelven tóxicos, (2) deficiencia debido a la falta de producción o pérdida excesiva de un compuesto necesario, y (3) conversión de un compuesto que se encuentra en concentración elevada en un metabolito alterado que a su vez es un material tóxico (Fig. 47-11). En general, los defectos en el metabolismo intermediario resultan en alteraciones de compuestos con un peso molecular menor que aquellos que se ven en las enfermedades de almacenamiento lisosomal. Como resultado, es más probable que dichos compuestos produzcan manifestaciones más agudas y es menos probable que estén asociados con rasgos físicos notables como los que prevalecen en las enfermedades de almacenamiento lisosomal. Los defectos en el metabolismo intermediario resultan en la perturbación de un proceso metabólico normal y a menudo producen una excreción urinaria elevada de un metabolito anormal. Por lo tanto, las pruebas de tamizaje de orina son los medios principales de reconocer la presencia de tal desorden, indicando el uso ensayos de diagnóstico más específicos.

Aminoacidopatías.

La Tabla 47-5 es una lista de los desórdenes más comunes de los aminoácidos y sus caracterizaciones químico clínicas. La fenilcetonuria (PCU) es el más conocido y mejor comprendido de los desórdenes de los aminoácidos. Este desorden hereditario autosómico recesivo ocurre como un defecto de la conversión de la fenilalanina a tirosina debido a una deficiencia de la enzima fenilalanina hidroxilasa (FAH).



La deficiencia de fenilalanina hidroxilasa produce una desviación del metabolismo de la fenilalanina hacia varios cetoácidos, el principal de los cuales es el ácido fenilpirúvico. Esta enfermedad ocurre en aproximadamente 1 de cada 15,000 niños recién nacidos. La actividad enzimática está restringida al hígado, y por lo tanto el diagnóstico se logra a través de la demostración de alteraciones en el metabolismo de la fenilalanina.

El tamizaje del cloruro férrico de la orina en el recién nacido ha sido utilizado tanto para el diagnóstico como para el manejo de la dieta desde la temprana infancia; para el primero ha sido suplantado por la prueba de Guthrie, en la cual se utiliza un ensayo por inhibición bacteriana para detectar un nivel elevado de fenilalanina. En el recién nacido la prueba de Guthrie es considerada positiva cuando el nivel de fenilalanina excede los 60mg/L. Dado un resultado positivo, aproximadamente en 1 en 10 a 1 en 20 infantes tendrán efectivamente fenilcetonuria. El diagnóstico específico de fenilcetonuria después de una prueba de tamizaje positivo requiere la demostración de niveles plasmáticos de fenilalanina mayores que 200 mg/L en 2 días consecutivos mientras se proporciona alimentación normal. Después del



establecimiento de una restricción en la dieta de la ingesta de fenilalanina, las pruebas de tamizaje de orina se revertirán al estado normal. El monitoreo subsiguiente de los niños que son controlados en la dieta, requiere de determinaciones plasmáticas cuantitativas de los niveles de fenilalanina.

El gen para la fenilalanina hidroxilasa (FAH) ha sido mapeado en el cromosoma 12q22-q24.1. Aproximadamente han sido definidos 50 haplotipos sobre la base de siete polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (PLFR, ver pág. 975). La mutación de bases más común entre los blancos es una sustitución de G a A en el intrón 12; esta mutación es en el haplotipo 3 y la combinación está ampliamente distribuida por Europa. Las mutaciones de FAH observadas en los afroamericanos se encuentran distribuidas entre los cinco haplotipos, uno de estos es común y otro raro en los blancos, siendo los otros tres únicos para los afroamericanos. Algunas mutaciones se encuentran en más de un haplotipo, reflejando ya sea una nueva mutación o un entrecruzamiento cromosómico.

La enfermedad de la orina de miel de maple, fue nombrada así debido al olor obvio de la orina en los niños afectados. Esta enfermedad ocurre en aproximadamente uno de cada 250,000 niños nacidos. Muchos desórdenes del metabolismo de los aminoácidos se caracterizan por olores inusuales. El olor es generalmente el resultado de la excreción urinaria excesiva de un ácido orgánico que imparte un olor específico. Los tres aminoácidos de cadena ramificada, leucina, isoleucina y valina, sufren transaminación, transcetolación y decarboxilación a través de una vía común (Fig. 47-12). La orina de miel de maple, ocurre como resultado de una deficiencia en la enzima multimérica, la decarboxilasa de cetoácidos de cadena ramificada. Esta actividad enzimática reside en dos proteínas, E1 compuesta de las subunidades E1 α y E1 β , y E2. El gen para E1a ha sido clonado y asignado al cromosoma 19; E2 se encuentra en el cromosoma 1. Los mutantes de los tres loci han sido definidos.

La deficiencia de esta enzima resulta en la excreción urinaria elevada de análogos de cetoácidos de estos tres aminoácidos de cadena ramificada y da como resultado pruebas positivas para el tamizaje del cloruro férrico y de la dinotrofenol hidrazina. El plasma se caracteriza por aumentos en los niveles de leucina, isoleucina y valina. Este trastorno es rastreado en el recién nacido utilizando un sistema de ensayo de inhibición bacteriana, similar a la prueba de Guthrie, que detecta niveles elevados de leucina plasmática en el recién nacido. Después del diagnóstico, las dietas especiales que restringen la ingesta de isoleucina, leucina y valina combinadas con un monitoreo cuidadoso pueden proporcionar un control adecuado de esta enfermedad. Los niños afectados pero que no pueden ser detectados por el tamizaje del recién nacido dentro del primer mes de vida, generalmente se vuelven enfermos agudos con hipoglucemia y cetoacidosis. Sin un reconocimiento y tratamiento previos, sobreviene muy frecuentemente la muerte, y en aquellos en que la dieta se establece tarde, contraen un retardo mental significativo.

La homocistinuria generalmente se reconoce tarde en la niñez debido a las anomalías físicas con o sin retardo mental. La homocistina es un aminoácido intermediario en el metabolismo de la metionina en su transformación a cistina. La forma más común de homocistinuria ocurre debido a una deficiencia de la enzima cistationina sintetasa, produciendo niveles elevados de homocistina en el plasma y en la orina. El aumento de los niveles plasmáticos resulta en la conversión de la mayor parte de esta sustancia en metionina. Por consiguiente, se puede rastrear la homocistinuria en la sangre del recién nacido mediante el análisis de los niveles de metionina en el plasma. Esta condición resulta en manifestaciones

1936



clínicas a través de dos mecanismos: (1) los niveles elevados de homocistina han demostrado ser tóxicos para el endotelio vascular y responden por el fenómeno tromboembólico (obturación del cerebro o de los vasos sanguíneos del pulmón a través de coágulos sanguíneos) de esta enfermedad, y (2) la falla en la producción de cistina resulta en una deficiencia de este aminoácido esencial en el metabolismo del tejido conectivo, especialmente en el de colágena. Esta actividad enzimática de la cistationina sintetasa requiere como cofactor a la vitamina B piridoxina. Las diferentes mutaciones en el locus génico para la cistationina sintetasa causan dos formas distintas de homocistinuria. En aproximadamente la mitad de los pacientes con deficiencia de la cistationina sintetasa, se puede lograr un aumento suficiente de la actividad enzimática residual, por medio de la adición de dosis terapéuticas de piridoxina a la dieta esencialmente a fin de curar la enfermedad.

El reactivo de cianuro-nitroprusiato se utiliza como una prueba de tamizaje de la orina para esta enfermedad. El nitroprusiato se combina con los aminoácidos que contienen sulfhidrilo para producir un color rojo. El cianuro reduce los puentes disulfuro y da un resultado positivo del tamizaje. La homocistinuria y la cistinuria dan una reacción positiva del cianuro-nitroprusiato, mientras que el nitroprusiato de plata, el cual no reduce el puente disulfuro de la homocistina, da un resultado positivo solamente cuando hay cistinuria presente.

Acidurias Orgánicas

El metabolismo de los aminoácidos involucra varios pasos intermedios. Durante cada paso se producen ácidos orgánicos. Un defecto en el metabolismo subsiguiente de estos compuestos resulta en desórdenes que son caracterizados por una acidosis metabólica severa. Entre este grupo de trastornos, el síndrome de hiperglucemia cetótica está compuesto por varios defectos en el metabolismo de los ácidos propiónico y metilmalónico. Los aminoácidos, leucina, isoleucina, valina, treonina y metionina y los ácidos grasos de número impar conducen a la producción de propionil CoA, la cual es convertida a metilmalonil CoA. La metilmalonil CoA es convertida en succinil CoA, la cual puede entonces entrar al ciclo del ácido tricarboxílico (Fig. 47-13). Los niños con estos desórdenes generalmente son vistos dentro de las primeras pocas semanas de vida con cetoacidosis severa, la que puede estar acompañada por hipoglucemia. La orina produce una reacción fuertemente positiva de la dinitrofenil hidrazina y por medio del análisis de aminoácidos muestra aumentos notables de glicina. Si el ácido metilmalónico no es encontrado en la orina, se puede realizar un diagnóstico presuntivo de propionaciduria. Un diagnóstico definitivo de este desorden puede entonces buscarse a través de la demostración de la presencia de metilcitrato en la orina, el análisis cromatográfico de gas-líquido de los ácidos orgánicos en la orina, o el ensayo de la propionil CoA carboxilasa en las células cultivadas. La conversión de la propionil CoA a metilmalonil CoA utiliza la biotina como un cofactor, el cual en dosis terapéuticas puede favorecer la actividad residual de la enzima. La conversión de la metilmalonil CoA a succinil CoA involucra el metabolismo de B₁₂, la cual en dosis terapéuticas puede también resultar en un mejoramiento bioquímico significativo. En aquellos casos en los cuales la terapia por vitamina no resulta en una respuesta terapéutica importante, se utiliza una dieta de bajo contenido en proteínas.



Defectos en el Metabolismo de los Carbohidratos

La galactosemia es un síndrome de toxicidad asociado con una intolerancia a la galactosa de la dieta. Este desorden hereditario recesivo ocurre como resultado de una deficiencia de la enzima galactosa-1-fosfato uridiltransferasa.

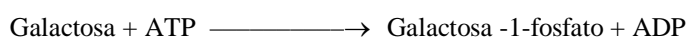
Gal-1-uridiltransferasa



La lactosa, compuesta de galactosa y glucosa, es el disacárido más importante en la leche de los mamíferos. La hidrólisis de la lactosa en el intestino da como resultado la liberación de los monosacáridos glucosa y galactosa. La vía principal del metabolismo de la galactosa en los humanos involucra la conversión de galactosa a glucosa por epimerización del grupo hidroxilo en la posición del carbono 4. La reacción catalizada por la galactosa-1-fosfato uridiltransferasa involucra a la galactosa-1-fosfato y la UDP-glucosa, produciendo UDP-galactosa y glucosa-1-fosfato. La UDP-galactosa puede producir, mediante una conversión posterior, UDP y glucosa-1-fosfato. Así, los humanos son capaces de metabolizar grandes cantidades de galactosa. Sin embargo, con la deficiencia de la enzima transferasa, la galactosa es reducida a galactitol y oxidada a galactonato. Es la presencia de estos dos productos intermediarios del metabolismo de la galactosa que tiene efectos tóxicos directos y que resulta en manifestaciones clínicas de galactosemia. La presentación clínica clásica de la galactosemia consiste en una falla en el desarrollo durante la infancia complicada por vómitos y diarrea. Además, estos niños muestran función hepática alterada con ictericia y hepatomegalia. Pueden tener lugar también varias hemólisis, y poco después del nacimiento pueden notarse cataratas. Sin una terapia en la dieta, puede suceder un retardo mental aparente después de solamente unos cuantos meses de nacidos. Muchos estados han instituido el tamizaje del recién nacido para la galactosemia utilizando el disco de la sangre colectada para la prueba de Guthrie en ensayos para la galactosa-1-fosfato uridiltransferasa. Las pruebas de tamizaje metabólicas de la orina a partir de niños agudamente enfermos deben incluir una prueba para la reducción de sustancias en la orina. Los tiras para orina impregnadas con glucosa oxidasa son específicas para la glucosa. Este tamizaje de orina sería negativo en la mayoría de los niños con galactosemia. Un niño con las manifestaciones clínicas descritas arriba con una prueba de la tira de orina negativa para la glucosa pero positiva para el sulfato de cobre para reducir sustancias en la orina, indica evidencia fuertemente presuntiva para la galactosemia. El control dietario de la enfermedad en los primeros pocos años de vida puede resultar en crecimiento y desarrollo normales.

Un segundo defecto en el metabolismo de la galactosa ocurre como resultado de deficiencia de la enzima galactocinasa:

Galactocinasa



Este desorden es reconocido más comúnmente después de un tamizaje de metabolitos



en la orina de los pacientes con cataratas. La deficiencia de galactocinasa resulta en la acumulación de galactitol como un producto final en el metabolismo de la galactosa. Este compuesto se acumula dentro del cristalino y es el responsable de las cataratas. No existen para este defecto ni manifestaciones hepáticas ni otras sistémicas. La enzima puede determinarse en los glóbulos rojos, y la excreción de galactosa y galactitol en la orina darán una reacción positiva para la reducción de sustancia. El reconocimiento temprano de este desorden y la eliminación de galactosa a partir de la dieta evitará el desarrollo de cataratas.

La acidosis láctica es una complicación comúnmente observada en muchas enfermedades que causan un aumento del metabolismo anaeróbico. Son raras las anomalías primarias en el metabolismo de los carbohidratos que conducen a una acidosis láctica. El metabolismo anaeróbico y el metabolismo defectuoso de los carbohidratos pueden dar origen a aumentos en las concentraciones de los ácidos pirúvico y láctico. Sin embargo, debido a que el piruvato es desviado rápidamente hacia lactato y que la mayor parte de los laboratorios clínicos realizan ensayos para el lactato pero no ensayos para piruvato, es reconocida más frecuentemente la acidosis láctica que la acidosis pirúvica y es referida como tal. Una anomalía primaria en el metabolismo del piruvato o en el metabolismo de la glucosa muscular en la mitocondria producirá un nivel aumentado de piruvato y lactato después de una carga de glucosa. Los pacientes con acidosis láctica en los que no se encuentra alguna anomalía aparente en la perfusión u oxigenación de la sangre tisular, pueden requerir pruebas adicionales para determinar una anomalía primaria en el metabolismo de los carbohidratos o del piruvato.

Enfermedades por almacenamiento de glucógeno (ver capítulo 31)

Las enfermedades por almacenamiento de glucógeno combinan dos tipos diferentes de defectos metabólicos. Primero, debido a las alteraciones en el metabolismo del glucógeno, los almacenamientos inadecuados de glucosa se encuentran disponibles para las necesidades metabólicas, y ocurren síntomas de hipoglucemia aguda. Segundo, la acumulación de glucógeno resulta en los efectos prolongados y crónicos de una enfermedad de almacenamiento. La Tabla 47-6 enumera un esquema de clasificación de las enfermedades por almacenamiento de glucógeno.

La forma clásica de la enfermedad para el almacenamiento de glucógeno es la enfermedad de von Gierke, la cual ocurre como resultado de una deficiencia de glucosa-6-fosfatasa. Todas las fuentes metabólicas de la glucosa sanguínea están canalizadas a través de la formación intrahepática de la glucosa-6-fosfato (ver capítulo 32). La glucosa bajo esta forma no puede ser transportada fuera de la célula hepática. De esta manera, la formación de glucosa a partir de los aminoácidos a través de la glucogenogénesis o de la conversión de otros carbohidratos en glucosa, utiliza el intermediario glucosa-6-fosfato. Con una deficiencia de la glucosa-6-fosfatasa, el único carbohidrato disponible para mantener la glucosa sanguínea es el metabolito de la glucosa, la glucosa-1-fosfato. Un esquema simplificado del metabolismo del glucógeno y las consecuencias de la deficiencia de la glucosa-6-fosfatasa se muestran en la Fig. 47-14. Los niños con la enfermedad del almacenamiento de glucógeno de tipo I, con deficiencia de la glucosa-6-fosfatasa, generalmente presentan episodios recurrentes de hipoglucemia dentro de los primeros pocos días de vida y son a menudo acompañados por cetoacidosis y por acidosis láctica. Si no hay aumento de glucosa sanguínea después de la administración de glucagón, puede suponerse un

1939



defecto en el metabolismo del glucógeno. El diagnóstico específico de la enfermedad por almacenamiento de glucógeno de tipo 1 requiere de una biopsia del hígado para la demostración de la deficiencia de glucosa-6-fosfatasa. Los niños con la enfermedad por almacenamiento de glucógeno de tipo 1 son incapaces de mantener una cantidad adecuada de glucosa sanguínea por más de 2 a 2^{1/2} horas después de una alimentación normal. El manejo de los niños con este desorden no puede lograrse satisfactoriamente a través del uso de alimentos orales frecuentes. Por esta razón, han sido utilizados tubos nasogástricos y gastrostomías alimenticias para mejorar el manejo de esta enfermedad durante los primeros pocos años de vida.

La enfermedad de Pompe, o enfermedad por almacenamiento de glucógeno de tipo I, es una condición completamente diferente de los otros tipos de enfermedades por almacenamiento de glucógeno. Este desorden es el resultado de un defecto en la degradación lisosomal del glucógeno. La enzima deficiente es la α -glucosidasa, una hidrolasa ácida similar a la enzima deficiente de otras enfermedades de almacenamiento lisosomales. La deficiencia de esta enzima resulta en un almacenamiento sistemático distribuido de glucógeno lisosomal, y se ve en la infancia con hepatomegalia, cardiomegalia, y hipotonía central. La enfermedad sigue un curso de rápido deterioro, con la muerte a alrededor del año a los 2 años de edad. Esta alteración del metabolismo del glucógeno no afecta la homeostasis normal de la glucosa. El diagnóstico de esta forma de enfermedad por almacenamiento de glucógeno es indicado por la acumulación lisosomal de glucógeno demostrada en la biopsia muscular o hepática. Puede determinarse la enzima α -glucosidasa en los linfocitos periféricos o en los fibroblastos cultivados de piel para realizar un diagnóstico específico. Debido a que esta enzima está presente en las células cultivadas, existe el diagnóstico prenatal de esta forma de enfermedad por almacenamiento de glucógeno.

Defectos del Transporte

Existen muchas condiciones que llevan a estados alterados del metabolismo como resultado de un defecto en el transporte de metabolitos a través de la membrana más que el resultado de una deficiencia enzimática en una vía metabólica. Después de la filtración glomerular de plasma, hay una reabsorción selectiva de metabolitos a través de los túbulos renales de manera que la orina contiene en última instancia solamente productos de desecho y se conservan los productos que no lo son. Los componentes de la membrana plasmática del túbulo renal determinados por un solo gen son responsables de la reabsorción selectiva de los compuestos individuales. Existe un mecanismo de reabsorción selectiva del túbulo renal para los cuatro aminoácidos cistina, lisina, ornitina y arginina. Los homocigotos para una mutación que involucra este sistema de reabsorción presentan una pérdida renal pronunciada de estos cuatro aminoácidos. La condición se conoce como cistinuria porque es la pérdida renal de la cistina que contribuye al trastorno clínico. La cistina es menos soluble en una orina ácida que en una orina alcalina. Con una pérdida renal aumentada de cistina, este aminoácido precipita para formar piedra en las papilas renales y en el sistema colector. La cistinuria que se observa desde la infancia temprana como una forma de insuficiencia renal crónica, generalmente se manifiesta primero como retardo en el crecimiento. El tamizaje metabólico de la orina debido a la falla en el crecimiento o baja estatura, detectará cistinuria a través de una reacción positiva del cianuro-nitroprusiato.

Existen varias condiciones en las que existe un transporte defectuoso de aminoácidos



en el riñón; estas se muestran en la Tabla 47-7.

El raquitismo resistente a la vitamina D, o raquitismo hipofosfatémico, representa un defecto en la reabsorción tubular renal de fosfato. Esta condición es hereditaria como un desorden dominante ligado a X. En consecuencia, su efecto es bastante variable en las mujeres heterocigotas quienes pueden no presentar manifestaciones clínicas o quienes pueden exhibir estatura baja moderada y evidencia de raquitismo. En los hombres afectados hay hipofosfatemia y hiperfosfaturia con estatura baja y piernas arqueadas que acompañan a la evidencia radiológica de raquitismo. El diagnóstico definitivo es realizado a través de la demostración de una excreción de fosfato muy elevada en una orina de 24 horas. Este desorden se denomina raquitismo resistente a la vitamina D debido a que las dosis masivas de vitamina D no corregirán los niveles alterados de calcio y fosfato en la sangre y en la orina. Con una ingesta regular de la tolerancia gastrointestinal máxima de fosfato, los hombres con esta condición pueden tener una mejora significativa del raquitismo y un aumento de su peso adulto. El fosfato es rápidamente liberado del plasma cuando es ingerido oralmente, y la terapia de reemplazo debe incluir una ingestión de fosfato cada cuatro horas. Esta enfermedad es la primera que se encontró como un mutante de un receptor hormonal; es un receptor intracelular de vitamina D₃.

Desórdenes del metabolismo mineral

El desorden más común que involucra el metabolismo mineral es la *enfermedad de Wilson*, o *degeneración hepatolenticular*. El cobre se acumula en cantidades patológicas. Este desorden hereditario autosómico recesivo que involucra al metabolismo del cobre se observa a menudo sintomáticamente como cirrosis en los adolescentes o como un trastorno psiquiátrico en adolescentes mayores o en jóvenes adultos. El gen responsable de la enfermedad de Wilson no ha sido clonado pero está estrechamente ligado a un marcador en el cromosoma 13. Aun cuando continúa desconociéndose la base genética exacta de la anomalía específica en el metabolismo del cobre, las alteraciones en los niveles tisulares y urinarios de cobre son evidencia diagnóstica para esta enfermedad. Clínicamente este desorden se caracteriza por una tríada de hallazgos: un síndrome neurológico particular, cirrosis del hígado, y anillos Kayser-Fleischer de la córnea. Las anomalías neurológicas toman dos formas: la primera es la degeneración lenticular (pérdida de la función cerebelar), la cual se conoce también como la forma distónica (movimiento y tonos musculares anormales) de la enfermedad. La segunda forma neurológica es la pseudoesclerosis. Esta involucra temblores y sacudidas de las muñecas y de los hombros asociados con rigidez y espasmos. La complicación hepática de esta enfermedad se manifiesta primeramente como un hígado alargado con esplenomegalia asociada. Posteriormente, el curso de la enfermedad es similar al de la hepatitis crónica. Por último la enfermedad progresa hasta un cuadro de cirrosis totalmente agobiante. El anillo de Kayser-Fleischer es considerado aun, como el único diagnóstico clínico más importante que se ha encontrado para la enfermedad. Es un anillo de una decoloración marrón-dorada o verdosa que aparece al margen de la córnea cerca del borde.

Se han realizado muchas investigaciones de laboratorio sobre el diagnóstico de la enfermedad de Wilson. La mayoría de los pacientes que presentan este desorden tendrán un nivel plasmático reducido de ceruloplasmina. La ceruloplasmina es una metaloglucoproteína que contiene cobre. Actúa como una oxidasa en la oxidación enzimática del hierro a partir del 1941



estado ferroso a férrico. Al comienzo del curso de esta enfermedad el nivel de cobre de la orina de 24 horas puede estar dentro del intervalo de referencia a ligeramente aumentado, pero se encuentra sorprendentemente elevado en los estados avanzados de la enfermedad. Con una sospecha clínica de este trastorno, un estudio de diagnóstico comprende la medición de cobre en la orina de 24 horas, seguida por una cuantificación de cobre en la orina de 24 horas durante la administración de penicilamina. Con niveles tisulares de cobre aumentados el agente quelante penicilamina causará un aumento muy grande en la excreción de cobre. La manera más definitiva de realizar un diagnóstico y en algunos casos, la única segura, es a través de la biopsia del hígado y del análisis tisular de contenido de cobre. La enfermedad de Wilson puede controlarse esencialmente por medio de la administración a largo plazo de penicilamina. Los pacientes con reacciones colaterales serias a la penicilamina pueden ser tratados con sulfato de zinc, el cual bloquea a los receptores de metalotionina en el tubo digestivo, evitando la reabsorción de cobre excretado por la bilis.

Un segundo desorden del metabolismo del cobre se conoce como el *síndrome de Menkes* o de la *enfermedad del cabello ensortijado*. Este desorden es una enfermedad neurológica recesiva ligada a X, que es observada al comienzo de la infancia con falla en el aprendizaje, letargo, hipotermia, y en la actividad de las convulsiones mioclónicas. El cabello puede parecer normal al nacimiento, pero posteriormente desarrolla un patrón característico. Al cabello le falta brillo y se encuentra de alguna manera pigmentado; también tiene una apariencia de acero. Los niños con el síndrome de Menke presentan bajos niveles séricos de cobre y de ceruloplasmina. Sin embargo, no ha sido exitoso el tratamiento mediante la administración de cobre. Un defecto en el transporte del cobre se demuestra por medio del estudio del metabolismo de cobre radiactivo en fibroblastos cultivados de piel. Este enfoque ha sido también exitosamente utilizado en el diagnóstico prenatal de esta enfermedad.

Trastornos del ciclo de la urea y de las hiperamonemias

La urea es el producto final primario del metabolismo del nitrógeno en los humanos. El metabolismo de las proteínas resulta en la producción de amonio, el cual entra al ciclo de la urea (Fig. 47-15) a través de la síntesis de carbamil fosfato y conduce a la formación de la urea por medio de la conversión de arginina a ornitina. Dentro de este ciclo se han reconocido cinco deficiencias enzimáticas diferentes, cada una de las cuales termina en hiperamonemia. La interrupción del ciclo de la urea no produce acidosis, cetosis o hipoglucemia, pero se manifiesta clínicamente como un efecto tóxico directo del amoniaco en el SNC. El diagnóstico clínico debe sospecharse en los niños con depresión del SNC después de una ingesta de proteína, una condición que debe indicar la realización de un análisis del nivel de amoniaco sanguíneo. El grado de hiperamonemia es masivo y en sí no indica un desorden particular sino más bien una interrupción del ciclo de la urea. La determinación cuantitativa de los aminoácidos del plasma y de la orina, puede mostrar aumentos en los aminoácidos, sugiriendo defectos en los primeros pasos del ciclo de la urea o demostrando que el compuesto específico se encuentra elevado en los últimos pasos del ciclo de la urea. Para el diagnóstico específico de las deficiencias de las enzimas carbamilsfosfato sintetasa y de la ornitina transcarbamilasa se requiere la biopsia del hígado usando un análisis enzimático. La citrulinemia, argininosuccinaciduria y argininemia son diagnosticadas por demostración de un aumento de estos sustratos a través de la cromatografía bidimensional en papel o por cromatografía en columna para el análisis de aminoácidos. El defecto de la enzima en esta



últimas tres condiciones se demuestra en los fibroblastos cultivados de piel.

Defectos de los receptores

Los receptores son productos génicos que funcionan como agentes citoplásmicos o unidos a membrana, necesarios para el transporte de compuestos específicos a través de membranas o como reguladores intracelulares de la actividad metabólica. El conocimiento de la función de los receptores ha mejorado tremendamente a través del estudio de los desórdenes de un único gen, que resultan en defectos de receptores específicos. Tales desórdenes genéticos se ilustran a través de las condiciones de los síndromes familiares de hipercolesterolemia y de resistencia a la testosterona (síndrome de feminización testicular).

La hipercolesterolemia familiar es un desorden hereditario dominante que es la causa más común de un solo gen de la enfermedad arterial coronaria y del infarto de miocardio en los adultos jóvenes. En los humanos, la lipoproteína de baja densidad (más conocida bajo su abreviatura inglesa LDL por “low density lipoprotein”) es el transportador de la mayor parte del colesterol del plasma. Después que el colesterol es sintetizado dentro del hígado, es transportado a las células dentro de las partículas de LDL hasta un receptor específico de la superficie celular. Después de la unión de las moléculas LDL a los receptores de la superficie celular, se forma una vesícula endocitósica, la cual se funde con los lisosomas. Dentro del lisosoma las moléculas de LDL son degradadas hasta aminoácidos, eventualmente libres de colesterol sin esterificar. A medida que las cantidades de colesterol son internalizadas, existe una supresión de la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMG-CoA) lo cual causa una reducción en la síntesis de colesterol celular. Recíprocamente, un requerimiento celular de colesterol estimula la actividad de la HMG-CoA reductasa. El desorden de la hipercolesterolemia familiar surge de una mutación que afecta al receptor de LDL. Con un número reducido de receptores celulares de superficie para colesterol-LDL y por lo tanto con una entrada reducida de colesterol, existe una supresión inadecuada de la actividad de la HMG-CoA reductasa. Esto resulta en una estimulación de la síntesis posterior de colesterol. El resultado neto es de hipercolesterolemia familiar o de tipo IIa. Existen individuos raros que son homocigotos para un defecto en el receptor de LDL. Durante el comienzo de la infancia dichas personas tienen niveles muy elevados de colesterol plasmático y una enfermedad grave de las arterias coronarias, que generalmente conduce a la muerte en la adolescencia. El estudio de los fibroblastos cultivados de piel a partir de las personas homocigotas afectadas permitió la elucidación del defecto en los receptores de LDL y en el efecto concomitante sobre la regulación de la actividad de HMG-reductasa. Como resultado de este trabajo, fue posible mostrar que la forma heterocigota más común de la hipercolesterolemia autosómica dominante representaba un defecto parcial en los receptores de LDL y en la regulación de la actividad de la HMG-CoA reductasa.

El *síndrome de la feminización testicular* es una designación antigua para un desorden que involucra una anomalía en el metabolismo de la testosterona. Los individuos afectados son mujeres fenotípicas que desarrollan características sexuales femeninas secundarias en la pubertad pero fracasan en experimentar la menarca. Una laparotomía en dicha persona mostrará ausencia de un útero y presencia de testículos intraabdominales. El análisis de los cromosomas revela un cariotipo normal masculino 46,XY. Estos individuos embriogénicamente cromosómicos masculinos desarrollan la genitalia externa de una mujer debido a una resistencia celular a la acción de la testosterona. Hay una producción normal de



testosterona por los testículos, pero no existe respuesta de los tejidos blanco a la testosterona. La acción de la testosterona (andrógenos) en las células blanco es mediada por receptores citoplásmicos específicos. La dihidrotestosterona se combina con una proteína de unión citosólica (receptor) para formar un complejo proteína-hormona que es transportado al interior del núcleo celular, en donde ejerce su acción sobre la cromatina. Un defecto en el receptor termina en una incapacidad de las células blanco para responder a la testosterona.

Desórdenes en el metabolismo de las purinas

El desorden más conocido que involucra un defecto en el metabolismo de las purinas es el *Síndrome de Lesch-Nyhan*. Los hombres afectados presentan un trastorno de auto-mutilación, retardo mental y disfunción cerebelar. Su orina contiene cantidades excesivas de cristales de ácido úrico. La característica hiperuricemia de este desorden hereditario recesivo ligado a X, es el resultado de una deficiencia de la hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (más conocida bajo su abreviatura inglesa HGPRT por “hypoxantine-guanine phosphoribosyltransferase”). Esta enzima forma parte del metabolismo de los nucleótidos de purina, el ácido guanílico o guanosil monofosfato (GMF) y el ácido inosínico o inosil monofosfato (IMF). Estas dos purinas regulan la actividad de varias enzimas del metabolismo de las purinas incluyendo a la HGPRT. La deficiencia de esta enzima resulta en una velocidad acelerada de la biosíntesis de purinas, y debido al bloqueo, se sintetizan grandes cantidades de hipoxantina y xantina, las cuales son rápidamente convertidas en el hígado, a cantidades masivas de ácido úrico por la xantina oxidasa. El alopurinol es utilizado en estos pacientes para reducir los niveles séricos y urinarios de ácido úrico, pero esto no altera las anomalías en el SNC que forman parte del padecimiento.

Cuando se cultivan células deficientes de HGPRT, ellas son resistentes a los efectos de los análogos de purina tales como la 8-azaguanina y la 6-mercaptopurina los cuales inhiben el crecimiento de las células normales. Debido a que el portador femenino para esta condición ligada a X por ionización posee células con HGPRT y células sin HGPRT, los fibroblastos crecerán tanto en medios normales como en medios con estos análogos de purina. Las células de una mujer no portadora crecerán en los medios normales pero no en los medios con el análogo. Este sistema que provee un medio selectivo ha demostrado ser una herramienta poderosa en la detección de los portadores del síndrome de Lesch-Nyhan. Cuando se encuentra disponible el diagnóstico prenatal, el estudio de mujeres en una familia que presenta esta condición es importante para el asesoramiento genético. El gen de HGPRT parece ser susceptible a un gran número de mutaciones, algunas de las cuales pueden ser visualizadas en un solo individuo o familia (mutaciones “privadas”). Esto hace más difícil el diagnóstico de este desorden por medios moleculares.

Desórdenes mitocondriales

Cada célula contiene cientos de mitocondrias, las cuales son organelos subcelulares responsables de un gran número de funciones metabólicas, incluyendo la mayor parte de los procesos oxidativos. Muchas de las proteínas y de las enzimas contenidas dentro de la mitocondria son codificadas por el genoma mitocondrial, un círculo de DNA de doble hélice, de 16.6 kilobases (kb) de longitud. Debido a que la mitocondria tiene también su propia maquinaria para la síntesis de proteínas y un código genético ligeramente diferente del que es utilizado por los genes nucleares, es conveniente que el aparato de traducción (incluyendo 22

RNAs de transferencia y los dos RNAs ribosomales) sea también codificado en el DNA mitocondrial. Las trece unidades de la cadena respiratoria que son los responsables de la producción de ATP, son codificadas por el DNA mitocondrial, incluyendo las proteínas que componen la NADH-Coenzima Q reductasa (Complejo I), la subunidad de citocromo b de la coenzima Q-citocromo c (complejo II), tres subunidades de la citocromo-c oxidasa, y las dos subunidades de la ATPasa (complejo IV). Las otras subunidades de estos complejos son codificadas por los genes nucleares. Varias enfermedades que han evidenciado ser compatibles con un modo de herencia maternal o ligada al sexo, han demostrado ser causadas por mutaciones en genes codificados en el DNA mitocondrial.

Un ejemplo clásico de un desorden mitocondrial ligado maternalmente es la *atrofia óptica de Leber*. Debido a que las mitocondrias son heredadas solamente a partir de la madre, las mujeres transmiten la enfermedad a los hijos e hijas; los hombres son más afectados que las mujeres, pero los hombres nunca transmiten la enfermedad a la descendencia. Un séptimo de las madres de los hombres afectados está afectadas también. En 1988, Wallace y cols. demostraron que esta enfermedad era causada por un error en el gen mitocondrial que codifica la subunidad 4 de la NADH-deshidrogenasa. Otras mutaciones puntuales originan miopatías mitocondriales (desórdenes musculares). Estas se caracterizan por síndromes con los acrónimos en inglés “MELAS” (myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes) y “MERF” (mioclonus, ataxia, seizures, dementia, and ragged red fibers). En estos casos las mutaciones ocurren en genes que codifican tRNAs. Los cambios mutacionales pueden consistir también de grandes deleciones o duplicaciones de los mismos genes, como en el *síndrome de Kearsn-Sayre* (oftalmoplegia progresiva, ptosis, miopatía proximal, retinopatía pigmentaria, ataxia y paro cardíaco) en el que una deleción de 4.9 kb de DNA remueve varios genes de tRNA a partir de la mitocondria, principalmente en músculos, o el síndrome de Pearson (anemia sideroblástica, disfunción pancreática exógena, acidosis láctica) en el que se encuentran grandes inserciones o deleciones en la mitocondria de todos los tejidos. El fenotipo mutante se encuentra tanto en la mitocondria normal como en la anormal de los individuos heteroplásmicos. Las manifestaciones clínicas son afectadas por la cantidad de mitocondrias mutantes en los tejidos relevantes de los individuos heteroplásmicos. La proporción puede variar de un tipo celular a otro y con la edad del individuo en formas que no están aún claras (Johns DR: Mitochondrial DNA in disease, *N.Eng. J. Med* 333: sept. 1995). Aun cuando la gravedad de la enfermedad parece correlacionar con la proporción de las mitocondrias afectadas en tejidos específicos, se han observado suficientes excepciones para indicar que falta mucho por aprender acerca de la biología de la mitocondria.

Desórdenes peroxisómicos

Los peroxisomas son organelos subcelulares que contienen enzimas oxidativas llamadas peroxidasas. El *síndrome hepatorenal cerebral de Zellweger* (craneofacial, dismorfología, anomalías de las manos y pies, riñones policísticos, y disgénesis intrahepática) es la anomalía peroxisómica prototípica. El ácido pipecólico elevado, las anomalías en el metabolismo de los ácidos grasos de cadena muy larga (beta oxidación deteriorada), y la ausencia de peroxisomas, todos indican que el defecto fundamental puede ser una anomalía estructural de este organelo. De hecho, se ha clonado un gen para el factor 1 de ensamble peroxisómico (FEP1) y se encontró que contiene una mutación puntual en una familia japonesa con un niño con el síndrome de CHR. La *adenoleucodistrofia*



neonatal y la *enfermedad infantil de Refsum* pueden ser considerados ejemplos adicionales de esta clase de defectos. Puesto que los peroxisomas contienen más de cuarenta enzimas y han sido identificados hasta ocho grupos de complementación en el síndrome de CHR, es probable que genes adicionales se encuentren también implicados en la biogénesis defectuosa de los peroxisomas.

Tamizaje Genético

Papel del tamizaje en masa

Las pruebas de tamizaje juegan un papel importante en el diagnóstico y en el estudio poblacional de las enfermedades genéticas (Tabla 47-8). Una prueba de tamizaje no está diseñada como una herramienta primaria de diagnóstico. Su propósito, es sobre todo, identificar una subpoblación de personas en quienes la elección de las pruebas de diagnóstico definitivo resultaría benéfico desde el punto de vista económico. En general, cuanto más específica es una prueba de tamizaje particular, mayor es su costo, y de esta manera reduce su utilidad para aplicarse en grandes poblaciones. Una prueba de diagnóstico definitivo para una entidad nosológica dada es aquella que posee una sensibilidad y especificidad cercana al 100 %. La sensibilidad de una prueba es una medida de que tan frecuentemente dicha prueba detecta el trastorno en cuestión. La especificidad de una prueba es una medida de lo bien que una prueba discrimina un desorden de otros desórdenes (ver capítulo 20 para detalles). La sensibilidad y especificidad que se requieren de una prueba de tamizaje dependen de la población que va a ser estudiada y del propósito para el que se emprende tal prueba. Esto se encuentra mejor ilustrado cuando se consideran los propósitos para las pruebas de tamizaje: (1) pruebas de tamizaje para la detección temprana de la enfermedad en el estado presintomático cuando existe terapia eficaz (fenilcetonuria o profilaxis con penicilina para la anemia falciforme), (2) detección de portador para la enfermedad hereditaria, especialmente en el contexto del diagnóstico prenatal (enfermedad de Tay-Sachs), y (3) estudios epidemiológicos de la frecuencia de un desorden dado dentro de la población (cariotipo 47,XXY o 47,XYY). Si una enfermedad puede ser tratada eficazmente cuando es detectada al inicio y si las consecuencias de la no-detección son inaceptables, es deseable tener una prueba con máxima sensibilidad para detectar todas las personas posiblemente afectadas. En aquellas personas identificadas a través de una prueba de tamizaje positivo pueden realizarse pruebas adicionales con ensayos más específicos destinados a establecer un diagnóstico exacto. Para enfermedades en las que no se encuentra disponible un tratamiento exitoso en forma rápida para las manifestaciones clínicas, deben utilizarse pruebas de tamizaje menos sensibles. Reduciendo la sensibilidad se puede mejorar la especificidad de la prueba. Las pocas personas con la enfermedad que en las que falló la prueba de tamizaje no estarán indebidamente comprometidas. El tamizaje universal para las hemoglobinopatías de célula falciforme en los recién nacidos es un ejemplo de una situación en donde las prioridades no son fácilmente establecidas. La electroforesis en acetato de celulosa es lo suficientemente sensible para detectar el gen para la HbS. El enfoque isoelectrico es una técnica muy sensible pero costosa para diferenciar el rasgo de la célula falciforme de la talasemia falsiforme de células β^+ . La característica de la célula falciforme es bastante común, sin embargo, la localización adicional de todos los heterocigotos con β^+ -talasemia sería muy costosa. De esta

manera, para los propósitos del tamizaje la mejor estrategia puede ser el uso de técnicas menos costosas como la electroforesis en acetato de celulosa seguida de la confirmación por enfoque isoelectrico con densitometría o por HPLC que pueda aplicarse a una población grande. El costo de localización de los niños con pruebas repetidas puede exigir un análisis inicial más definitivo.

Detección de los portadores heterocigotos

Durante los últimos 20 años se ha acumulado considerable información acerca de las anomalías moleculares específicas que subyacen muchos desórdenes determinados genéticamente. En los desórdenes recesivos hereditarios, el conocimiento del defecto molecular puede utilizarse para la detección de los portadores a través de la demostración de una expresión parcial del defecto molecular en los individuos heterocigotos. La exactitud de estas pruebas de detección de portadores, generalmente es directamente proporcional a la exactitud del ensayo que mide el defecto molecular específico del desorden en cuestión. Algunos sistemas de ensayo utilizados para la detección de los portadores de los desórdenes recesivos hereditarios se muestran en la Tabla 47-9. Han sido detectadas algunas anomalías bioquímicas en la fibrosis quística (FQ), siendo la más notable un aumento en el contenido de cloruros en la transpiración. El gen de FQ está genéticamente ligado al de la enzima paroxonasa y ha sido clonado por clonación posicional y localizado en el cromosoma 7. El regulador de la conductancia transmembranal de la fibrosis quística (RTFQ), como se le llama al gen, es grande y codifica una proteína de 148 residuos de aminoácidos (ver adelante y el capítulo 48). Su estructura indica que es un regulador del transporte de cloruros a través de membrana, cuyo defecto permite que el agua y el cloro se escapen de las células involucradas, resultando en secreciones viscosas asociadas con la enfermedad. La mutación más severa, dF508, se caracteriza por una delección de un codón de fenilalanina en la posición del aminoácido 508 del gen. Este alelo es responsable del 70% de las mutaciones en este locus, y los homocigotos constituyen aproximadamente el 57% de las personas con FQ. La mayoría de los pacientes restantes con FQ está compuesta de heterocigotos con mutaciones que pueden involucrar un gran número de alelos adicionales.

Esto ocasiona un dilema sustancial de salud pública. El estudio en masa de la población usando la hibridización de oligonucleótidos específicos para un alelo, que detectará una gran proporción de heterocigotos será muy costoso. El uso de un número menor de oligonucleótidos reducirá la sensibilidad.

Diagnóstico prenatal

Una vez que la prevalencia de una enfermedad demuestra ser lo suficientemente alta para justificar la inversión que implica el establecimiento de un método para detectar esa enfermedad, hay varios criterios que debe seguir un método de diagnóstico si se quiere usar exitosamente en el diagnóstico prenatal. Primero, debe tener un medio para identificar parejas con riesgo suficiente de una condición particular para garantizar que se tomen los riesgos y costos de la amniocentesis y otros procedimientos de diagnóstico. Los padres pueden ser considerados que están en riesgo de producir descendencia con enfermedad genética porque ellos tienen al menos un hijo con un defecto genético de nacimiento con un riesgo de recurrencia significativa, porque han sido determinados por detección previa de un portador,



guiados quizás por el conocimiento de su origen racial o étnico, por ser portadores de un desorden hereditario recesivo, o por la edad de la madre.

Segundo, el desorden bajo estudio debe, por su naturaleza, garantizar el diagnóstico prenatal. Hoy en día esto es generalmente correcto, ya que la mayor parte de todas las condiciones para las cuales se encuentra disponible un diagnóstico prenatal son desórdenes graves para los que no existe una terapia efectiva a ser aplicada a los niños afectados.

Tercero, la exactitud del método de diagnóstico utilizado debe ser bien establecida ya que existe poco margen de error en estos estudios. Para los diagnósticos de muchos desórdenes genéticos y desórdenes bioquímicos que utilizan células cultivadas de líquido amniótico, el laboratorio recibe una muestra de 20 a 30 mL para una sola oportunidad de establecer un cultivo y desarrollar un número limitado de ensayos. Los resultados de estos ensayos serán usados para determinar si el embarazo deberá continuarse. Se desea tener una confianza extrema en los sistemas utilizados bajo estas circunstancias.

Las técnicas del DNA recombinante que han demostrado ser exitosas en el estudio de la estructura y función génicas, han proporcionado el medio para el diagnóstico prenatal exacto de varias condiciones. El ejemplo mejor conocido es la prueba para el diagnóstico prenatal de la enfermedad de la célula falciforme. Con esta enfermedad ha sido posible combinar el uso de las endonucleasas de restricción que reconocen el cambio de nucleótidos específicos del gen de la célula falciforme con sondas que se unen a la porción del gen de la hemoglobina que codifica la cadena de beta-globina. El uso de la reacción en cadena de la polimerasa es más sensible y más rápido y no requiere del uso de radioisótopos. La hibridización del oligonucleótido para el alelo específico de (OAE) permite la detección de anomalías en pares de bases que no son detectables por el uso del análisis de la endonucleasa de restricción. El OAE inverso emplea fragmentos múltiples de DNA (oligonucleótidos) para varias sustituciones de bases talasémicas que están unidas a una sola membrana y luego son hibridizadas con el DNA genómico marcado. La técnica de ASO inversa permite probar múltiples mutaciones simultáneamente. Todas estas técnicas no requieren ni el cultivo de las células del líquido amniótico ni estudios especiales de los padres, siempre que se demuestre que son portadores conocidos de la enfermedad de la célula falciforme. Es posible imaginar un momento en que las pruebas y las endonucleasas de restricción existirán para el diagnóstico de todos los desórdenes genéticos. Ver el capítulo 48 para una descripción más detallada de estas técnicas.

El cuadro siguiente enumera las diversas modalidades diagnósticas en los diagnósticos prenatales, con un ejemplo de cada uno.

Prueba de la Alfa-fetoproteína

Tamizaje de la alfa-fetoproteína sérica materna

La alfa-fetoproteína (AFP) es una proteína plasmática fabricada por el hígado del feto. El plasma de una mujer no embarazada prácticamente no contiene AFP cuantificable. Durante el embarazo, el nivel de AFP sérico materno está relacionado con el nivel de AFP en el líquido amniótico. Cualquier condición fetal que resulta en un paso aumentado de plasma fetal al líquido amniótico aumentará el nivel de AFP del suero materno. Tales condiciones incluyen defectos de los tubos neurales abiertos, tales como la anencefalia o meningocele;

defectos de la pared abdominal, como gastroquisis u omfalocele; y pérdida renal de las proteínas del plasma a partir del síndrome nefrótico congénito. Estos desórdenes pueden ser rastreados por medio de la medición de la concentración de la AFP en el suero materno. Sin embargo, los niveles elevados de AFP de suero materno son también indicativos de complicaciones del embarazo en ausencia de una malformación fetal; tales complicaciones incluyen transfusión fetomaternal, riesgo aumentado de nacimiento prematuro, alto riesgo de muerte fetal, y presencia de gemelos.

A partir de una experiencia empírica se ha encontrado que la expresión del nivel de AFP en valores múltiplos de la mediana (MdM) lleva a una mejor correlación con el riesgo infantil que lo que permite el uso de desviaciones estándar. La mayoría de los programas de tamizaje utilizan 2.5 MdM como el límite superior del intervalo de referencia para el suero materno; esto es aproximadamente equivalente a 5 desviaciones estándar por encima de la media. La cantidad de AFP producida por el feto es relativamente constante de embarazo a embarazo, pero el nivel de AFP del suero materno variará con el volumen de la sangre materna. Es necesario ajustar esto corrigiendo por el peso materno. Otros factores que afectan el nivel de suero materno son la diabetes y la raza. El nivel de AFP del suero materno varía con la edad gestacional, aumentando gradualmente durante el momento apropiado para el tamizaje, de 14 a 24 semanas de embarazo. El nivel en MdM del suero materno se basa en la determinación de la mediana para cada semana gestacional del embarazo, y la interpretación requiere datos exactos del embarazo.

Un análisis retrospectivo del tamizaje del suero materno de los niveles elevados de AFP mostraron una correlación entre los bajos niveles de AFP y la presencia de un feto con el síndrome de Down. Esta correlación fue confirmada posteriormente en una serie de estudios prospectivos de manera que, comúnmente, los niveles bajos de AFP del suero materno son considerados una indicación para la amniocentesis y la determinación del cariotipo fetal. También existe una correlación independiente entre la edad materna y el riesgo de un feto con el síndrome de Down; una edad materna de 35 años o mayor es la indicación más común para la prueba diagnóstica prenatal por amniocentesis o el muestreo de vello coriónico. Los niveles de AFP de suero materno pueden ser expresados como un riesgo para el síndrome de Down para edades maternas específicas. De esta manera, si la edad de una mujer y su bajo nivel de AFP se combinan para generar un riesgo equivalente al de una mujer de 35 años, se le recomienda a la madre un diagnóstico prenatal.

Metodos de Diagnóstico Prenatal

Células cultivadas de fluido amniótico

Citogenético

Edad materna avanzada para el
síndrome de Down

Bioquímico

Ensayos de hexosaminidasa para
la enfermedad de
Tay-Sachs

Análisis morfológico

Microscopía electrónica para la mucopolidosis IV



Análisis de sustrato
Cobre radiactivo en el síndrome de Menke
Células sin cultivar de fluido amniótico
Análisis restrictivo por endonucleasa
Estudio del gen de la beta-hemoglobina
en la enfermedad de célula falciforme
Polimorfismos genéticos para el análisis de ligamiento
Determinación de HLA y de deficiencia de
21-hidroxilasa
Análisis de fluido amniótico
Cuantificación de los componentes marcadores
Alfa-fetoproteína para los defectos del tubo neural abierto
Análisis de metabolitos anormales
Metilmalonato en metilmalonicaciduria
Polimorfismos genéticos para el análisis de ligamiento
Estado secretorio y distrofia miotónica
Técnicas de imagen
Ultrasonografía
Riñones policísticos autosómicos recesivos
Roentgenografía
Displasia esquelética – acondrogénesis
Fetoscopia
Polidactilia en el síndrome de Elis-van Creveld
Muestra fetal
Muestra de sangre fetal
Ensayo del factor del antígeno VIII en la hemofilia
A
Biopsia de la piel
Apariencia histológica en la epidermolisis
distrófica agrandada.

Determinación de alfa-fetoproteína del fluido amniótico

La determinación de alfa-fetoproteína es una prueba de tamizaje que se considera aplicable a todos los embarazos. Cuando hay un resultado anormal, se recomienda una prueba adicional en la forma de ultrasonografía y amniocentesis. Normalmente, las determinaciones de AFP se realizan en cualquier momento que se extraigan las muestras del líquido amniótico para la amniocentesis para edad materna avanzada. Existe una marcada correlación entre el nivel de AFP del fluido amniótico y las condiciones fetales citadas antes; además, estos defectos estructurales pueden a menudo ser visualizados por ultrasonografía. Si la AFP es elevada en el suero materno y, después de la amniocentesis, no se detecta ningún defecto fetal en el fluido amniótico por medio de la ultrasonografía, la electroforesis de la acetilcolinesterasa del fluido amniótico revelará una banda específica si se encuentra presente un defecto de tubo neural abierto. Los niveles de AFP del fluido amniótico varían también con la edad gestacional; los niveles se expresan como MdM con la mediana establecida para cada semana gestacional de embarazo entre las 16 y las 26 semanas.

Métodos de Análisis



Cada enfermedad causada por un error genético de nacimiento resulta en un único defecto en una proteína o en una función enzimática o en ambos. La consecuencia de este defecto es un patrón singular de cambio del compuesto analizado en los fluidos biológicos. Las Tablas 47-4 a 47-11 enumeran los cambios de patognómicos del compuesto analizado para muchas de estos defectos genéticos. Además, se muestran también, los hallazgos clínicos más importantes para cada enfermedad.

Alfa₁-antitripsina

STEVEN C. KAZMIERCZAK

Principios de análisis y uso actual

La alfa₁-antitripsina (AAT) es una glucoproteína con un peso molecular de aproximadamente de 55,000 daltones que se encuentra en el suero y en otros fluidos corporales. La AAT migra en la región alfa₁ en la electroforesis en gel de agarosa a pH 8.6. Los sitios más importantes de la síntesis de AAT son los hepatocitos y los macrófagos alveolares. En el suero, la AAT es la responsable de alrededor del 90% de la actividad antitripsina total, inhibiendo una variedad de enzimas proteolíticas incluyendo la tripsina, la quimotripsina, la elastasa, la collagenasa y la plasmina.[ref\(1869\)](#) La AAT es una proteína reactiva de fase aguda que puede aumentar en concentración en el suero de dos a tres veces en condiciones como inflamación, enfermedad neoplásica, embarazo y después de la administración de estrógenos.[ref\(1870\)](#) La deficiencia de AAT se encuentra fuertemente asociada con la enfermedad temprana de obstrucción pulmonar, mientras que la deficiencia severa está asociada con un alto riesgo de desarrollar enfisema pulmonar.[ref\(1871\)](#) Debido a que la AAT inhibe un amplio rango de enzimas proteolíticas además de la antitripsina, el nombre *inhibidor de la alfa₁-proteasa* es más apropiado para la AAT.

Las concentraciones de AAT en el suero pueden ser aproximadas por el uso de la separación electroforética de las proteínas de suero (Tabla 47-12, método 1). Debido a que la AAT constituye aproximadamente el 90% de la banda de alfa₁-globulina, la deficiencia de la enzima resulta en la ausencia virtual de esta fracción proteica.

La medida de AAT puede ser llevada a cabo por el uso de métodos inmunoquímicos o funcionales. Los primeros miden la concentración de proteína presente, mientras que los últimos indican la actividad funcional, o capacidad de la AAT para inhibir la actividad de proteasa.

La medida de la capacidad de AAT para inhibir la tripsina puede ser llevada a cabo por medición del porcentaje de actividad de tripsina conocida que es inhibida por el suero (Tabla 47-12, método 2).[ref\(1872\)](#) Además de la inhibición de la tripsina por la AAT, la elastasa ha sido también utilizada para evaluar la capacidad inhibitoria de proteasa de la AAT.[ref\(1873\)](#) Aunque hay quienes han cuestionado la utilidad de los ensayos para determinar la actividad funcional de la AAT, hay estudios que indican que en los fumadores de cigarrillos, la actividad funcional de la AAT se reduce aun cuando la concentración inmunoquímica puede ser normal o encontrarse aumentada.[ref\(1874\)](#)

La mayor parte de las determinaciones de AAT realizadas en los laboratorios clínicos



miden la concentración de AAT en el suero por medio del uso de técnicas inmunoquímicas. El método inmunoquímico más común en uso para la medición de AAT en el suero es la inmunonefelometría (Tabla 47-12, método 3). Esta técnica mide el aumento de la dispersión de la luz como resultado de la formación del complejo AAT-anticuerpo anti-AAT. Las muestras que contienen cantidades crecientes de AAT producirán más complejos antígeno-anticuerpo generando una mayor velocidad en el incremento de la dispersión de la luz cuando se comparan con las muestras con bajas concentraciones de AAT.

Un pequeño porcentaje de los laboratorios mide concentraciones de AAT por medio del uso de las técnicas de inmunodifusión como la inmunodifusión radial (Tabla 47-12, método 4). En este procedimiento, el suero que contiene AAT se aplica a gel de agarosa que contiene anticuerpo anti-AAT. El suero que contiene AAT difunde dentro del gel en donde el diámetro del precipitado del anticuerpo-anti-AAT es relacionado con las concentraciones de AAT en la muestra.

La medida de la actividad de AAT en las muestras fecales se lleva a cabo mediante la evaluación de la enteropatía de pérdida de proteína en los pacientes con la enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, o inflamación causada por patógenos entéricos.[ref\(1875\)](#) La AAT es resistente a la digestión proteolítica dentro del tracto gastrointestinal, y dicha propiedad la hace un marcador útil para la actividad de la enfermedad. La técnica más comúnmente utilizada para medir AAT en las muestras de heces es la de inmunodifusión radial.[ref\(1876\)](#) También han sido desarrollados métodos inmunonefelométricos para medir AAT en las muestras de heces. Sin embargo, los estudios que comparan los métodos inmunonefelométricos versus la inmunodifusión radial para la AAT en heces, revelan que la inmunodifusión radial tiene mejor sensibilidad y un valor predictivo mayor que las técnicas inmunonefelométricas.[ref\(1877\)](#)

Los individuos en los que se sospecha que presentan deficiencia de AAT pueden caracterizarse posteriormente de acuerdo a su genotipo de AAT. Se han descrito varios genotipos para la deficiencia de AAT, algunos de los cuales se encuentran asociados con las bajas actividades de AAT. El alelo más común del gen AAT se designa como PiM. La mutación Z resulta de la sustitución de una sola base del alelo M normal. Los individuos con el fenotipo ZZ AAT presentan una deficiencia grave asociada de AAT. El método que se realiza más comúnmente para evaluar el fenotipo de un paciente de AAT es la separación electroforética usando gel de almidón ácido seguido por electroforesis cruzada del antígeno-anticuerpo (Tabla 47-12, método 5). La primera separación electroforética separa a AAT en varias fracciones de proteína marcadas como Z, S, M y F del cátodo hacia el ánodo, respectivamente.[ref\(1878\)](#) Las diferencias de carga que causan las diferentes velocidades de migración son provocadas por sustituciones de aminoácidos en las diversas fracciones. El segundo paso utilizado en este procedimiento para determinar los fenotipos AAT consiste en llevar a cabo la electroforesis perpendicular a la primera separación de manera que las fracciones de AAT migren dentro de la agarosa que contiene el anticuerpo dirigido contra AAT. Las bandas de precipitina aparecen cuando AAT y el anticuerpo reaccionan dentro del gel. El procedimiento requiere experiencia técnica y toma aproximadamente 1^{1/2} días para ser completado.

Otro método común en uso para la evaluación de un individuo con fenotipo AAT es el enfoque isoeléctrico en gel de poliacrilamida (Tabla 47-12, método 6).[ref\(1879\)](#) Este ensayo se lleva a cabo con el uso de gel de poliacrilamida con 3% de entrecruzamiento, lo que crea un



ligero efecto de tamiz molecular. Se produce un gradiente de pH en el gel por el uso de anfolinas, sustancias compuestas de ácido poliamino-policarboxílicos. Se utilizan anfolinas con un rango de pH de 3 a 6. Después de la separación electroforética, se utiliza el colorante azul de Coomassie R-250 para teñir las bandas.

Los métodos actuales para determinar el fenotipo AAT como la electroforesis en gel ácido de almidón y el enfoque isoeléctrico requieren habilidades técnicas y experiencia que no se consiguen muy fácilmente en la mayoría de los laboratorios debido a la poca frecuencia con que se realiza la prueba. Los métodos alternativos que han sido considerados incluyen el uso de anticuerpos monoclonales ya sea para la AAT-Z o la ATT no-Z^{ref(1880)} y un ensayo colorimétrico minisecunciador en fase sólida para la detección de la mutación Z del gen de AAT.^{ref(1881)}

Muestra

El suero es la muestra de elección para el análisis de AAT cuando se usa la inmunodifusión radial o la inmunonefelometría. Las muestras pueden ser mantenidas refrigeradas a 4° C hasta 5 días; sin embargo, el almacenamiento a -20C es óptimo.

Los estudios fenotípicos pueden ser llevados a cabo con el uso del suero o plasma. Los especímenes pueden almacenarse hasta dos semanas a -20C; para períodos de almacenamientos mayores, es preferible el congelamiento a -70C. Las muestras que se almacenan inapropiadamente o que presentan contaminación bacteriana pueden mostrar alteración en las velocidades de migración de las bandas de AAT.^{ref(1882)}

Las muestras de heces obtenidas para análisis de AAT pueden almacenarse a 4° C hasta 3 días. Las muestras pueden ser almacenadas congeladas a -20C hasta el análisis.

Intervalo de Referencia

Los intervalos de referencia para la cuantificación de AAT por medio del uso de nefelometría son aproximadamente de 0.9 a 2.1 g/L.^{ref(1883)} Existen diferencias no significativas en las concentraciones de AAT relacionadas con el sexo y con la edad, aunque los recién nacidos pueden tener concentraciones ligeramente mayores, las cuales declinan hasta los rangos de los adultos en un lapso de aproximadamente 60 días.^{ref(1884)}

Tamizaje de carbohidratos

STEVEN C. KAZMIERCZAK

Principios de análisis y uso corriente

La detección de carbohidratos en la orina es clínicamente importante en la evaluación de ciertos errores congénitos del metabolismo y para la evaluación de otras condiciones que conducen a la excreción de carbohidratos en la orina. La glucosa es el carbohidrato que es más frecuentemente ensayado en la orina. Para las determinaciones de glucosa han sido desarrollados tantos procedimientos cuantitativos como semicuantitativos. La prueba de tamizaje semicuantitativo para la glucosa, así como para otros carbohidratos reductores, es una modificación de la prueba de Benedict (Tabla 47-13, método 1; ver también pág. 634). La sensibilidad de este ensayo para detectar la glucosa es de aproximadamente 3500 mg/L cuando



se usa el método de dos gotas y de 2500 mg/L al usar el procedimiento de 5 gotas. Aun cuando este procedimiento adolece de una falta de sensibilidad, su falta de especificidad para la glucosa lo hace útil para el tamizaje de otros azúcares reductores incluyendo la galactosa, fructosa, lactosa, manosa y xilulosa. Los compuestos no carbohidratos, que pueden interferir con este ensayo produciendo una reacción positiva, incluyen ácido siálico y ácido homogentísico. La glucosa en la orina puede determinarse por medio del uso de procedimientos enzimáticos cuantitativos que emplean glucosa oxidasa o hexocinasa (Tabla 47-13, método 2; ver también capítulo 32). Un resultado positivo de la prueba obtenido con el uso del reactivo Clinitest no específico acoplado a un resultado negativo de la prueba que se obtiene con el uso del método enzimático específico para glucosa, sugiere fuertemente la presencia de azúcares no reductores diferentes de la glucosa. Desafortunadamente, esta técnica no detecta la presencia de sacarosa u otros carbohidratos no reductores.

La identificación en la orina de otros carbohidratos diferentes a la glucosa requiere de esquemas más elaborados para separar los diferentes carbohidratos que pueden estar presentes. La cromatografía en papel (Tabla 47-13, método 3) y la cromatografía en capa fina (Tabla 47-13, método 4) son las técnicas que se emplean más a menudo para la detección de los carbohidratos urinarios. La cromatografía en capa fina es más sensible y brinda información más exacta cuando se la compara con la cromatografía en papel.[ref\(1885\)](#) Se han descrito varios sistemas de solventes para ser usados tanto para la cromatografía en papel como para la de capa fina.[refs\(1886\)](#) Una variedad de medios de soporte ha sido también usada en la cromatografía en capa fina.

Los colorantes de detección química varían en su capacidad para detectar los carbohidratos separados por cromatografía en papel o en capa fina. Los reactivos de aplicación general incluyen el ftalato de anilina y el fosfato de anilina. Estos colorantes detectan rápidamente la mayor parte de los carbohidratos excepto la fructosa y otras cetonas, los cuales se tiñen pobremente, y la sacarosa, la cual no reacciona en absoluto. Otros colorantes químicos que pueden ayudar en la detección de estos carbohidratos incluyen el reactivo de fosfato de anilina-difenilamina, el cual detecta sacarosa y el naftoresorcinol, que reacciona con los ceto azúcares.

Muestra

Una muestra de orina al azar es adecuada para el tamizaje de carbohidratos urinarios. Las muestras deben ser congeladas tan pronto como sea posible inmediatamente después de la colecta para evitar la degradación bacteriana de los carbohidratos. Las muestras son estables durante 12 meses cuando son congeladas a -20°C .

Intervalo de Referencia

Los individuos saludables no tienen carbohidratos detectables en la orina. Los niños prematuros y, en menor grado, los niños que nacen en el período normal pueden excretar pequeñas cantidades de glucosa durante las primeras semanas de vida. Además de glucosa, la galactosa también puede verse en la orina durante ese tiempo. Después de 1 mes de edad, sin embargo, la presencia de carbohidratos en la orina debe ser considerada como un hallazgo anormal.



Ceruloplasmina

STEVEN C. KAZMIERCZAK

Principios de análisis y uso actual

La ceruloplasmina, la principal proteína con cobre en el plasma, es también un compuesto de la fase aguda tardía que se sintetiza en el hígado. Durante la electroforesis de proteínas en gel de agarosa o acetato de celulosa, migra en la región α_2 del electroforetograma. La ceruloplasmina normalmente no brinda ninguna contribución visible a la banda α_2 excepto en ocasiones en donde la concentración de la proteína se ve extremadamente aumentada.

Una función de la ceruloplasmina es la oxidación de Fe^{2+} a Fe^{3+} como un paso preliminar para la unión del hierro a la transferrina. La ceruloplasmina puede ayudar también a evitar la toxicidad por cobre. Una función final de la ceruloplasmina puede ser la de un antioxidante, evitando la peroxidación lipídica y mediando la producción de radicales libres en los estadios inflamatorios.

Se han empleado una amplia variedad de técnicas para la medición de ceruloplasmina. Los primeros métodos que fueron desarrollados estaban basados en la medición de la actividad de oxidasa de la enzima (Table 47-14, método 1). En estos métodos, la ceruloplasmina reacciona con un sustrato para formar un producto coloreado.[ref\(1887\)](#) Los sustratos en uso más comunes son la *p*-fenilenediamina y el dihidrocloruro de *o*-dianisidina. Estos métodos están sujetos a interferencia de ciertos aniones y compuestos orgánicos.[ref\(1888\)](#) Los iones de metales libres como los iones cúprico y ferroso pueden oxidar al sustrato causando resultados erróneamente aumentados. La inhibición de la reacción puede ocurrir con muestras que contengan elevadas concentraciones sanguíneas del nitrógeno de urea ($\text{BUN} > 1 \text{ g/L}$), bilirrubina ($> 163 \text{ mg/L}$), y ácido úrico ($> 200 \text{ mg/L}$).[ref\(1889\)](#) Se prefiere el uso de *o*-dianisidina al de *p*-fenilendiamina como sustrato porque este último no es específico para la ceruloplasmina, y tanto la fenilalanina como su producto no son tan estables como la *o*-dianisidina y su producto.

Los métodos más comunes en uso actualmente para las determinaciones de las concentraciones de ceruloplasmina son los procedimientos inmunoquímicos que incluyen la inmunodifusión radial (Table 47-14, método 3). Los métodos inmunoquímicos son más específicos para la ceruloplasmina y menos sujetos a interferencias químicas cuando se los compara con los procedimientos enzimáticos.

Muestra

El suero es la muestra de elección para las determinaciones de ceruloplasmina. El plasma anticoagulado con EDTA o citrato es inadecuado para usarse con los métodos enzimáticos y también no se recomienda su uso en los procedimientos inmunoquímicos. Se prefiere el suero extraído fresco, pero las muestras almacenados a 4°C son estables hasta 3 días. Los ejemplares congelados a -20°C son estables hasta 4 semanas.

Intervalo de Referencia

Cuando se utiliza un procedimiento inmunonefelométrico, el intervalo de referencial normal para la ceruloplasmina en los adultos es de 250 a 630 mg/L. Los factores como la



edad, sexo, y uso de hormonas pueden afectar las concentraciones de ceruloplasmina. Los neonatos tienen concentraciones menores de ceruloplasmina, las cuales no alcanzan los niveles adultos hasta las 3 a 6 semanas de edad. Las mujeres que toman anticonceptivos orales muestran mayores concentraciones de ceruloplasmina cuando se las compara con las mujeres de edad similar.[ref\(1890\)](#)

Colinesterasa

STEVEN C. KASZMIERCZAK

Principios de análisis y uso actual

La colinesterasa (CE) es un término genético usado para describir un grupo de enzimas relacionadas que hidrolizan los ésteres de colina. Dos tipos de colinesterasas están presentes en la sangre: la acetilcolinesterasa (AcCE) denominada también GR, o colinesterasa eritrocitaria; y la pseudocolinesterasa (BuCE), denominada también colinesterasa del plasma o del suero.[ref\(1891\)](#) Los sustratos utilizados para la AcCE incluyen la acetilcolina y la acetil-b-metilcolina; la BuCE puede utilizar la butirilcolina, propionilcolina y benzoilcolina. Ambas enzimas, la AcCE y la BuCE hidrolizan la acetilcolina. La AcCE puede hidrolizar la acetilcolina y la propionilcolina esencialmente a la misma velocidad, mientras que hidroliza la butirilcolina muy lentamente. Por el contrario, la BuCE hidroliza la butirilcolina a una velocidad más rápida que para la propionilcolina, mientras que la acetilcolina es lentamente hidrolizada. Esta diferencia en la especificidad de sustrato permite la determinación dentro de una misma muestra, de ambas actividades enzimáticas, la AcCE y BuCE.

La medición de la CE se lleva a cabo generalmente para la evaluación del envenenamiento por compuestos organofosforados, para la identificación de la presencia de variantes genéticas anormales de CE, y en el fluido amniótico como un marcador para la presencia de defectos del tubo neural.

Los primeros métodos químicos para la medida de la CE fueron métodos de titulación,[ref\(1892\)](#) manométricos,[ref\(1893\)](#) y electrométricos[ref\(1894\)](#) basados en la medición del ácido formado. Estos métodos históricos ya no son utilizados.

Los métodos espectrofotométricos son los métodos más comunes actualmente en uso (ver el método en la Tabla 47-15). El sustrato típicamente usado es la acetilcolina que es hidrolizada por la CE para formar tiocolina. La tiocolina formada reacciona con el 5,5'-ditiobis(2-ácido nitrobenzoico)(DTNB) para formar un producto coloreado amarillo, cuya formación es monitoreada a 412 nm.[ref\(1895\)](#) Han sido propuestas modificaciones de este procedimiento incluyendo el uso de ácido 6,6'-ditiodinicotínico en lugar de DTNB[ref\(1896\)](#) como reactivo acoplante y el uso de acetilcolina en lugar de acetiltiocolina como sustrato, con la formación subsecuente de peróxido de hidrógeno después de la reacción de la colina oxidasa con la colina.[ref\(1897\)](#)

Se han descrito también una variedad de procedimientos misceláneos para la CE. Estos incluyen técnicas radiométricas que utilizan acetilcolina marcada con ^{14}C o ^3H en la parte del acetato,[ref\(1898\)](#) procedimientos fluorométricos,[ref\(1899\)](#) técnicas de electrodo de selectivo iones,[ref\(1900\)](#) y el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (más conocido bajo su abreviatura inglesa ELISA por "enzyme-linked immunoabsorbent assay").[ref\(1901\)](#)



Muestra

Tanto el suero o el plasma con heparina o EDTA son muestras aceptables. El suero debe ser separado tan pronto como sea posible, ya que puede ocurrir un aumento del 25% de la actividad de la BuCE en el suero cuando se le deja en contacto con el coágulo por 24 horas.[ref\(1902\)](#) Las muestras pueden ser almacenadas hasta por un año a -20°C . Sin embargo, las muestras mantenidas a temperatura ambiente por varias horas pueden mostrar pérdida en la actividad enzimática.

Intervalo de Referencia

Los individuos de hasta 6 meses de edad poseen actividades de CE del 40% al 50% de los niveles de los adultos.[ref\(1903\)](#) Las actividades de CE en las mujeres adultas jóvenes (<35 años) son de aproximadamente 64% a 74% de los encontrados en los hombres adultos. Las mujeres embarazadas muestran actividades disminuidas de CE comparadas con las mujeres no embarazadas.[ref\(1904\)](#)

Las actividades de AcCE en los neonatos son aproximadamente el 65% de las encontradas en los adultos y alcanzan valores adultos al año de edad.[ref\(1905\)](#) Se han notado diferencias en las actividades de la AcCE no relacionadas con el sexo.

Agradecimientos

Los editores desean agradecer a los autores anteriores por los siguientes métodos: Alfa₁-antitripsina y ceruloplasmina, Gayle Jackson; a la detección de carbohidratos, Helen Berry; Colinesterasa, Mary Ellen King.

Referencias

1. Prinsen JH, Schweisfurth H, Rasche B, Breuer J: Comparison of three methods for the determination of serum alpha-antitrypsin in patients with pulmonary diseases, *Clin Physiol Biochem* 7:198-202, 1989.
2. Viedma JA, de la Iglesia, Parera M, Lopez MT: A new automated turbidimetric immunoassay for quantifying α_1 -antitrypsin in serum, *Clin Chem* 32:1020-1022, 1986.
3. Carrell RW, Owen MC: Alpha₁-antitrypsin: structure, variation and disease, *Essays Med Biochem* 4:83-119, 1978.
4. Cooper GR, editor: *Selected methods of clinical chemistry*, 8:149-153, Washington, D.C., 1977, American Association for Clinical Chemistry.
5. Nethercott SE, Kalsheker NA: Kinetic fluorimetric assay for alpha₁-antitrypsin elastase-inhibitory capacity in serum, *Clin Chem* 34:178-179, 1988.
6. Cox DW, Billingsley GD: Oxidation of plasma alpha₁-antitrypsin in smokers and nonsmokers and by an oxidizing agent, *Am Rev Resp Dis* 130:594-9, 1984.
7. Brouwer J, Smekens F: Determination of α_1 -antitrypsin in fecal extracts by enzyme immunoassay, *Clin Chim Acta* 189:173-180, 1990.
8. Wilson CM, McGilligan K, Thomas DW: Determination of fecal α_1 -antitrypsin concentration by radial immunodiffusion: two systems compared, *Clin Chem* 34:372-376, 1988.
9. Buffone GJ, Shulman RJ: Characterization and evaluation of immunochemical methods for the measurement of fecal α_1 -antitrypsin, *Am J Clin Pathol* 83:326-330, 1985.
10. Morse JO: Alpha-₁-antitrypsin deficiency. Part 1, *N Engl J Med* 299:1045- 1048, 1978.
11. Zegers ND, Classen E, Gerritse K, et al: Detection of genetic variants of α_1 -antitrypsin with site-specific



- monoclonal antibodies, *Clin Chem* 37:1606-1611, 1991.
12. Harju L, Weber T, Alexandrova L, et al: Colorimetric solid-phase minisequencing assay illustrated by detection of α_1 -antitrypsin Z mutation, *Clin Chem* 39:2282-2287, 1993.
 13. Ritchie RF, Smith R: Immunofixation II: application to typing of alpha-1-antitrypsin at acid pH, *Clin Chem* 22:1735-1737, 1976.
 14. Gaidulis L, Muensch HA, Maslow WC, Borer WZ: Optimizing reference values for the measurement of alpha-1-antitrypsin in serum: comparison of three methods, *Clin Chem* 29:1838-1840, 1983.
 15. Tietz NW: *Clinical guide to laboratory tests*, Philadelphia, 1983, Saunders.
 16. Young DS, Jackson AJ: Thin-layer chromatography of urinary carbohydrates: a comparative evaluation of procedures, *Clin Chem* 16:954-959, 1970.
 17. Szustkiewicz C, Demetriou J: Detection of some clinically important carbohydrates in plasma and urine by means of thin-layer chromatography, *Clin Chim Acta* 32:355, 1971.
 18. Mukerjee H: A kinetic method for determination of serum ceruloplasmin, *Clin Chem* 36:391-392, 1990.
 19. Schosinsky KH, Lehmann HP, Beeler MF: Measurement of ceruloplasmin from its oxidase activity in serum by use of *o*-dianisidine dihydrochloride, *Clin Chem* 20:1556-1563, 1974.
 20. Curzone G, Spezler BE: Inhibitors of ceruloplasmin, *Biochem J* 105:243-250, 1967.
 21. Tietz NW: *Clinical guide to laboratory tests*, Philadelphia, 1983, Saunders, p 108.
 22. Milne DB, Johnson PE: Assessment of copper status: effect of age and gender on reference ranges in healthy adults, *Clin Chem* 39:883-887, 1993.
 23. Dass P, Meja M, Landes M, et al: Check sample, *Clin Chem* 34:135-158, 1994.
 24. Crane CR, Sanders DC, Abbot JN: Cholinesterase use and interpretation of cholinesterase measurements. In Sunshine I, editor: *Methodology for analytical toxicology*, Cleveland, 1975, CRC Press.
 25. Ammon R: Die fermentative Spaltung des Acetylcholine, *Pflugers Arch Ges Physiol* 233:486-491, 1933.
 26. Ravin HA, Tsou KC, Seligman AM: Colorimetric estimation and histochemical demonstration of serum cholinesterase, *J Biol Chem* 191:843-857, 1951.
 27. Ellman GL, Courtney KD, Andres V Jr, Featherstone RM: A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochem Pharmacol* 7:88-95, 1961.
 28. Brownson C, Watts DC: The modification of cholinesterase activity by 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) included in the coupled spectrophotometric assay, *Biochem J* 131:369-374, 1973.
 29. Abernethy MH, Fitzgerald HP, Ahern KM: An enzymatic method for erythrocyte acetylcholinesterase, *Clin Chem* 34:1055-1057, 1988.
 30. Johnson CD, Russel RL: A rapid, simple radiometric assay for cholinesterase, suitable for multiple determinations, *Anal Biochem* 64:229-238, 1975.
 31. Parvari R, Pecht I, Soreq H: A microfluorometric assay for cholinesterase, suitable for multiple kinetic determinations of picomoles of released thiocholine, *Anal Biochem* 133:450-456, 1983.
 32. Baum G, Ward FB: General enzyme studies with a substrate-selective electrode: characterization of cholinesterase, *Anal Biochem* 42:487-493, 1971.
 33. Brock A: Inter and intraindividual variations in plasma cholinesterase activity and substance concentration in employees of an organophosphorous insecticide factory, *Br J Ind Med* 48:562-567, 1991.
 34. Zsigmond EK, Downs JR: Plasma cholinesterase activity in newborns and infants, *Can Anaesth Soc* 18:278-283, 1971.
 35. Howard J, East N, Chaney J: Plasma cholinesterase activity in early pregnancy, *Arch Environ Health* 33:277-279, 1978.
 36. Kaplan E, Tildon JT: Changes in red cell enzyme activity in relation to red cell survival in infancy, *Pediatrics* 32:371-375, 1963.

Bibliografia

1958



Caskey CT, Pizzuti A, Fu YH, et al: Triplet repeat mutations in human disease, *Science* 256:784-789, 1992.

de Grouchy J, Turleau C: *Clinical atlas of human chromosomes*, New York, 1977, Wiley & Sons.

Kelly TE: *Clinical genetics and genetic counseling*, ed 2, St. Louis, 1986, Mosby.

King RA, Rotter JI, Motulski AG: *The genetic basis of common diseases*, New York, 1992, Oxford University Press.

McKusick VA: *Mendelian inheritance in man*, ed 10, Baltimore, 1992, Johns Hopkins University Press.

Neufeld EF: Natural history and inherited disorders of a lysosomal enzyme, beta hexosaminidase, *J Biol Chem* 264:10927-10930, 1989.

Poulton J: Mitochondrial DNA and genetic disease, *Dev Med Child Neurol* 35:833-840, 1993.

Scriver CR, Rosenberg LB: *Amino acid metabolism and its disorders*, Philadelphia, 1973, Saunders.

Shimozawa N, Tsukamoto T, Suzuki Y et al: A human gene responsible for Zellweger syndrome that affects peroxisome assembly, *Science* 255:1132-1134, 1992.

Simpson JL: *Disorders of sexual differentiation*, New York, 1976, Academic Press.

Stanbury JB, Wyngaarden JB, Fredrickson DS, et al, editors: *Metabolic basis of inherited disease*, ed 5, New York, 1983, McGraw-Hill.

Thomas GH, Howell RR: *Selected screening tests for genetic metabolic diseases*, St. Louis, 1973, Mosby.

Tablas

Tabla 47-1. Enfermedades causadas por varias mutaciones genéticas.

Tipo de Proteína	Consecuencias de la mutación	Ejemplo
Enzima	Pérdida de la actividad enzimática	Fenilcetonuria
Hemoglobina	Agregación proteica alterada	Enfermedad de célula falciforme
Proteína estructural (colágeno de cartílago)	Matriz ósea defectuosa	Osteogénesis imperfecta
Receptor	Regulación metabólica alterada	Hipercolesterolemia familiar
Proteína de membrana	Transporte de membrana alterado	Cistinuria
Proteína de coagulación	Coagulación defectuosa	Hemofilia
Proteína	Incapacidad para	Hemocromatosis



transportadora transportar compuesto

Tabla 47-2. Hallazgos de manchas de Barr en anomalías de cromosomas sexuales.

Cariotipo	Sexo	Cuerpo de Barr	Cuerpo Y
46,XX	F	+	0
46,XY	M	0	+
45,X	F	0	0
47,XXX	F	++	0
48,XXXX	F	+++	0
49,XXXXX	F	++++	0
47,XXY	M	0	++
47,XYY	M	+	++
48,XXYY	M	+	++
49,XXXXY	M	+++	+

Tabla 47-3. Desórdenes de tipo Hurler.

Desórdenes	Prueba de tamizaje
Mucopolisacaridosis	Tamizaje urinario para la mucopolisacariduria
Mucopolipidosis ML II y ML III	Niveles séricos de hidrolasas ácidas Acido siálico ligado a la orina
Glucoproteínosis	TLC de oligosacáridos urinarios Acido siálico unido en orina

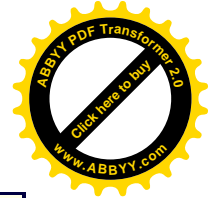
Tabla 47-4. Mucopolisacaridosis.

Eponimo	Número	Mucopolisacariduria	Deficiencia enzimática
Hurler	HPS I-H	DS, HS	α -L-Iduronidasa
Scheie	MPS I-S	DS, HS	α -L-Iduronidasa
Hurler-Scheie	MPS I-H/S	DS, HS	α -L-Iduronidasa
Hunger	MPS II	DS, HS	Iduronido sulfatosulfatasa
Sanfilippo	MPS III-A	HS	Heparan-N-sulfatosulfatasa
Sanfilippo	MPS III-B	HS	α -glucosaminidasa
Sanfilippo	MPS III-C	HS	Acetil-CoA: α -glucosaminida

Morquino A	AMPS VI-A	KS	<i>N</i> -acetiltransferasa
Morquino B	BMPS IV-B	KS	Galactosaminil-6-sulfato
Maroteaux-Lamy	MPS VI	DS	sulfatasa α -Galactosidasa
Sly	MPS VII	DS o HS o DS,HS	Galactosaminil-4-sulfato sulfatasa (arylsulfatasa B) β -glucoronidasa
<i>DS</i> , Dermatan sulfato; <i>HS</i> , heparan sulfato; <i>KS</i> , queratan sulfato.			

Tabla 47-5. Errores congénitos del metabolismo intermediario de los aminoácidos.

Condición:	Alcaptonuria*
Enzima defectuosa:	Homogentisato oxigenasa
Rasgos bioquímicos:	Excreción urinaria de ácido homogentísico
Rasgos clínicos:	Orina oscura; ocronosis; artritis en edad avanzada
Tratamiento:	Desconocido
Condición:	Fenilcetonuria**
Enzima defectuosa:	Fenilalanina 4-hidrolasa
Rasgos bioquímicos:	Acumulación de fenilalanina en la sangre, LCR, etc; excreción urinaria de ácido fenilpirúvico y compuestos relacionados
Rasgos clínicos:	Deficiencia mental severa, epilepsia; EEG anormal, eczema, desórdenes en el comportamiento
Tratamiento:	Dieta pobre en fenilalanina comenzando a edad temprana.
Condición:	Albinismo***
Enzima defectuosa:	<i>o</i> -difenol oxidasa (tirosinasa)
Rasgos bioquímicos:	Falta de melanina en la piel, cabello y ojos
Rasgos clínicos:	Fotofobia, histagmus, carcinomas de la piel
Tratamiento:	Desconocido
Condición:	Cretinismo por bocio (varios tipos)
Enzima defectuosa:	(1) Tirosina iodinasa (2) Enzima acoplante (3) Deiodinasa
Rasgos bioquímicos:	Falta de la hormona tiroidea
Rasgos clínicos:	Cretinismo, bocio
Tratamiento:	Tiroides, tiroxina o triiodotironina
Condición:	Enfermedad de la orina tipo jarabe (leucinosis)
Enzima defectuosa:	Enzima responsable de la decarboxilación oxidativa de los ácidos α -cetoisocaproico, α -ceto- β -metil- <i>n</i> -valérico y α -cetoisovalérico.
Rasgos bioquímicos:	Leucina, isoleucina y valina se acumulan en la



Rasgos clínicos:	sangre, CFS, etc; excreción urinaria de los 3 cetoácidos y compuestos relacionados Degeneración cerebral; generalmente muerte temprana, forma benigna con deficiencia enzimática parcial; sin síntomas excepto durante las infecciones, etc.
Tratamiento:	Dieta baja en leucina, isoleucina y valina
Condición:	Cistinosis
Enzima defectuosa:	Cistina reductasa (?)
Rasgos bioquímicos:	La cistina es depositada en el sistema reticulo-endotelial; aminoaciduria, glucosuria, proteinuria, fosfaturia, orina diluída
Rasgos clínicos:	Enanismo, fotofobia, acidosis renal, hipocalcemia, raquitismo resistente a vitamina; muerte antes de la pubertad; Una variante benigna ocurre en los adultos (no renal?)
Tratamiento:	Paliativo: sales de potasio, alcalis, vitamina D; dieta pobre en cistina y metionina (eficacia dudosa)
Condición:	Homocistinuria
Enzima defectuosa:	L-Serina dehidratasa
Rasgos bioquímicos:	Excreción urinaria de homocistina
Rasgos clínicos:	Retardo mental, defectos de retina, lentes dislocadas, malar romo, trombosis
Tratamiento:	Dieta pobre en metionina, alta en cistina; piridoxina.
Condición:	Hiper glucemia (varios tipos)
Enzima defectuosa:	(Incierta, depende del tipo)
Rasgos bioquímicos:	La glicina se acumula en la sangre, etc; excreción urinaria de glicina y en un tipo, de ácido metilmalónico.
Rasgos clínicos:	Letargo neonatal y cetosis, neutropenia, hipo- γ -globulinemia; retardo mental.
Tratamiento:	Dieta baja en proteína.
Condición:	Oxalosis
Enzima defectuosa:	Conversión excesiva de glicina en ácido oxálico
Rasgos bioquímicos:	El oxalato de calcio se acumula en los riñones, corazón, médula ósea y cartílagos.
Rasgos clínicos:	Nefrocalcinosis que conduce a falla renal progresiva.
Tratamiento:	Desconocido
Condición:	Histidinemia
Enzima defectuosa:	Histidina amonioliasa
Rasgos bioquímicos:	Excreción urunaria de ácido β -imidazolpirúvico y compuesto corazón, médula relacionados
Rasgos clínicos:	Defectos en el habla; retardo mental en algunos
Tratamiento:	Dieta baja en histidina



Condición:	Tirosinemia familiar
Enzima defectuosa:	Fumaril acetoacetasa
Rasgos bioquímicos:	Niveles aumentados de tirosina en la sangre; excreción urinaria de ácidos fenólicos relacionados con la tirosina; aminoaciduria generalizada; glucosuria; fructosuria.
Rasgos clínicos:	Hígado rápidamente agrandado; ictericia; hipoprotrombinemia; muerte común en la infancia; los sobrevivientes pueden tener raquitismo resistente a la vitamina D y acidosis.
Tratamiento:	Dieta baja en tirosina y fenilalanina (eficacia dudosa)
Condición:	Hiperprolinemia Tipo I
Enzima defectuosa:	Pirrolina-5-carboxilato reductasa
Rasgos bioquímicos:	Hiperprolinemia; excreción urinaria de prolina, glicina e hidroxiprolina.
Rasgos clínicos:	Retardo mental, convulsiones, enfermedad renal, sordera.
Tratamiento:	Desconocido Tipo II
Enzima defectuosa:	Pirrolina-5-carboxilato deshidrogenasa
Rasgos bioquímicos:	Ver Tipo I
Rasgos clínicos:	Ver Tipo I
Tratamiento:	Ver Tipo I
Condición:	Hidroxiprolinemia
Enzima defectuosa:	3-Hidroxipirrolina-5-carboxilato reductasa (?)
Rasgos bioquímicos:	Niveles altos de hidroxiprolina en sangre y orina
Rasgos clínicos:	Retardo mental (?)
Tratamiento:	Desconocido
Condición:	Citrulinemia
Enzima defectuosa:	Argininosuccinato sintetasa
Rasgos bioquímicos:	Niveles altos de citrulina en sangre y orina; amonio sanguíneo aumentado; excreción normal de urea.
Rasgos clínicos:	Retardo mental, epilepsia, vómitos, intoxicación por amonio.
Tratamiento:	Dieta baja en proteína
Condición:	Aciduria argininosuccínico
Enzima defectuosa:	Argininosuccinato liasa
Rasgos bioquímicos:	Excreción urinaria de ácido argininosuccínico; Niveles altos de amonio en sangre y LCR; excreción normal de urea.
Rasgos clínicos:	Retardo mental, convulsiones, anormalidades en el cabello, intoxicación por amonio.
Tratamiento:	Dieta baja en proteína
Condición:	Hiperamonemia Tipo I
Enzima defectuosa:	Ornitina carbamiltransferasa
Rasgos bioquímicos:	Amonio sanguíneo alrededor de 10



		mg/L; excreción normal de urea.
Rasgos clínicos:		Retardo mental, intoxicación por amonio.
Tratamiento:		Dieta baja en proteína (?)
		Tipo II
Enzima defectuosa:		Carbamil-fosfato sintasa
Rasgos bioquímicos:		Ver Tipo I
Rasgos clínicos:		Ver Tipo I
Tratamiento:		Ver Tipo I
De Geigy scientific tables, ed 7, 1970, Ciba-Geigy Corp, Summit, N-J		
* Incidencia 1 en 100, 000		
** La incidencia varia desde 1 a 3200 en 10 ⁷ de acuerdo a la localidad.		
*** Incidencia de 1 en 13, 000		

Tabla 47-6. Errores congénitos del depósito o de la utilización de glucógeno.

Condición:	Deficiencia de glucosa-6-fosfato (enfermedad de von Gierke)
Tipo Cori:	1
Rasgos bioquímicos:	El glucógeno normal se acumula en el hígado y en el riñón
Rasgos clínicos:	Hepatomegalia, hipoglicemia; crecimiento raquíptico con edad ósea retardada, etc.
Condición:	Glucogenosis idiopática generalizada (enfermedad de Pompe)
Tipo Cori:	2
Rasgos bioquímicos:	El glucógeno normal se acumula en todos los órganos.
Rasgos clínicos:	Fallo cardíaco, hipotonía muscular, desórdenes neurológicos, muerte en la infancia.
Condición:	Deficiencia de dextrina-1,6-glucosidasa (desramificante) (dextrinosis límite; enfermedad de Forbes)
Tipo Cori:	3
Rasgos bioquímicos:	Glucógeno anormal con ramificaciones cortas depositadas en el hígado y algunas veces en los músculos esquelético y cardíaco.
Rasgos clínicos:	Hepatomegalia, hipoglicemia; menos severa que la enfermedad de von Gierke.
Condición:	Deficiencia de α -glucano-ramificante glicosiltransferasa (amilopeptinosis; enfermedad de Andersen)
Tipo Cori:	4
Rasgos bioquímicos:	Carbohidrato anormal con largas ramificaciones internas y externas depositadas en el hígado, bazo, y nódulos linfáticos.

Rasgos clínicos:	Cirrosis hepática; muerte dentro de los 2 años de nacimiento.
Condición:	Deficiencia de glucógeno fosforilasa (muscular) (Síndrome de McArdle)
Tipo Cori:	5
Rasgos bioquímicos:	Acumulación moderada de glucógeno normal en músculos esqueléticos; los niveles sanguíneos de lactado y piruvato bajan durante el ejercicio.
Rasgos clínicos:	Fatiga y dolor muscular generalizados.
Condición:	Deficiencia de glucógeno fosforilasa (hepática) (Enfermedad de Hers)
Tipo Cori:	6
Rasgos bioquímicos:	El glucógeno normal se acumula en el hígado; contenido reducido de fosforilasa del hígado y leucocitos
Rasgos clínicos:	Hepatomegalia; relativamente benigno.
Condición:	Deficiencia de UDP glucosa glucógeno glucosiltransferasa (glucógeno sintetasa)
Tipo Cori:	7
Rasgos bioquímicos:	Glucógeno hepático casi completamente ausente
Rasgos clínicos:	Hipoglucemia severa en ayunas
De: Geige's scientific tables, ed 7, 1970, Ciba Geigy Corp, Summit, N.J. De Field RA. En Stanbury JB et al., editores: <i>The metabolic basis of inherited disease</i> , ed 2, New York 1966, McGraw-Hill, p.141; Hers HG: <i>Adv. Metab Disord</i> 1:1, 1964; <i>Control of glycogen metabolism</i> , Ciba Foundationsymposium, London, 1964, Churchill.	

Tabla 47-7. Errores en el transporte renal de aminoácidos.

Desorden	Análisis urinario	Hallazgos
Cistinuria	Nitroprusiato de cianuro urinario	Falla renal que resulta v piedras de cistina.
Aminoaciduria hiperdibásica	Lisina, ornitina y arginina urinarias elevadas.	Autosómico asintomático dominante.
Síndrome de Fanconi	Aminoácidos, bicarbonato, fosfato, glucosa, potasio y ácido úrico, urinarios elevados.	Falla en el crecimiento en forma primaria, ocurre secundariamente en la enfermedad de Wilson y galactosemia.
Glucoglicinuria	Glucosuria, glicinuria	Autosómico asintomático

		dominante
Enfermedad de Hartnup	Aminoácidos neutros y aromáticos elevados.	Asintomático con buena nutrición, especialmente con ácido nicotínico.
Iminoglicinuria familiar renal	Prolina, hidroxiprolina y glicina urinarias elevadas	Autosómico asintomático recesivo
Síndrome de Lowe (oculocerebrorenal)	Aminoaciduria, proteinuria, aciduria y fosfaturia renales	Cataratas ligada a X recesivas, retardo mental, e hipotonía

Tabla 47-8. Tests de detección genéticos.

Naturaleza de la prueba de tamizaje	Condición(es) detectada(s) para	Prueba diagnóstica definitiva
Manchas bucales para los cuerpos de Barr.	Anormalidades numéricas del cromosoma X	Cariotipo de linfocitos sanguíneos periféricos
Ensayo del suero para porcentaje de hexosaminidasa A	Portadores de la enfermedad de Tay-Sachs	Hexosaminidasa A en los leucocitos periféricos
Test de Guthrie para el nivel sanguíneo semicuantitativo de fenilalanina.	Fenilcetonuria entre los niños recién nacidos.	Nivel plasmático cuantitativo de fenilalanina.
Determinación de alfa-fetoproteína del suero materno.	Detección en el útero, de defectos del tubo neural y del síndrome de Down.	Amniocentesis para cromosomas, alfa-fetoproteína y acetilcolinesterasa.
Volumen corpuscular medio de GR	Portadores de talasemia	Electroforesis o cromatografía de hemoglobina
Herramienta para la actividad de tripsina.	Fibrosis quística entre los recién nacidos.	Prueba de sudor para 1 mes de edad.
Niveles séricos de CC para el hombre con caminar lento	Distrofia muscular Duchenne	Análisis de restricción

Azúcar sanguíneo en ayuno o glucosa sanguínea de 2 horas después de la comida	Diabetes mellitus	Teste de tolerancia a la glucosa
Orina para las sustancias reductoras	Recién nacidos con ictericia	Galactosemia
Heces y morfología de GR entre los niños negros	Enfermedad de la anemia falciforme	Electroforesis de hemoglobina
Test de nitroprusiato urinario entre las personas con lentes dislocadas	Homocistinuria	Aminoácidos plasmáticos cuantitativos
Tiempos de sangrado y coagulación en la evaluación preoperatoria	Hemofilia A	Niveles plasmáticos del factor VIII

Tabla 47-9. Detección de portador para las enfermedades genéticas.

Enfermedad	Prueba de portador	Hallazgos
Enfermedad de célula falciforme	Electroforesis de hemoglobina	Bandas de hemoglobina 5 y A
Enfermedad de Tay-Sachs	Hexosaminidasa(Hex) A sérica y ensayo total	% de Hex A < 45%
Síndrome de Hurler	Ensayo de α -L-Iduronidasa	Control del nivel < 50%
Distrofia muscular Duchenne	Ensayo de CC sérica	Niveles elevados
Hemofilia A	Ensayo del factor VIII Genotipeando DNA	Nivel bajo Genótipo de portadores en la familia
Fenilcetonuria	Prueba de tolerancia a la fenilalanina (phe) Análisis del genotipo de DNA	Después de la comida nivel de phe mayor que lo normal Genótipo de un paciente portador



Tabla 47-10. Errores congénitos del metabolismo de las purinas y pirimidinas.

Condición:	Gota (hiperuricemia)
Enzima o sistema defectuoso:	Síntesis excesiva de ácido úrico a partir de precursores
Rasgos bioquímicos:	Concentración de ácido úrico aumentada en suero y a menudo en orina
Rasgos clínicos:	Ataques agudos de artritis, artritis crónica con deposición de urato en los tejidos; los cálculos de urato urinario causan daño en el riñón; asintomático en el 80% de los casos.
Incidencia y genética:	Hiperuricemia en 1% a 2%, gota clínica en 2 a 4/1000; probablemente autosómico dominante con expresión variable y de sexo modificada
Condición:	Xantinuria
Enzima o sistema defectuoso:	Deficiencia de xantino oxidasa y reabsorción tubular renal defectuosa de xantina
Rasgos bioquímicos:	Xantina excretada en grandes cantidades
Rasgos clínicos:	Cálculos de xantina en el tracto urinario
Incidencia y genética:	Raro recesivo
Condición:	Oroticaciduria
Enzima o sistema defectuoso:	Ausencia de orotidina-5'-fosfato pirofosforilasa o de decarboxilasa o de ambos.
Rasgos bioquímicos:	Acido orótico acumulado y excretado en la orina
Rasgos clínicos:	Varias anemias megaloblásticas, cristaluria por ácido orótico
Incidencia y genética:	Muy raro; recesivo
Condición:	β -Aminoisobutiricaciduria
Enzima o sistema defectuoso:	Deficiencia de una enzima catabólica
Rasgos bioquímicos:	Excreción urinaria alta de ácido β -aminoisobutírico
Rasgos clínicos:	Daño
Incidencia y genética:	0 al 46%, dependiendo del grupo étnico; recesivo.

Tabla 47-11. Lipidosis.

Condición:	Enfermedad de Gaucher (a) “Adulta” (b) Infantil aguda (c) Neurológica juvenil y adulta
Acumulación de lípido:	Glucocerebrósido
Lugar:	Bazo, hígado, médula ósea, leucocitos Cerebro en (b) y (c); pulmón en (b)
Rasgos clínicos:	Esplenomegalia, a menudo voluminosa; hepatomegalia; anemia; desorden óseo; púrpura; degeneración cerebral en (b) y (c).
Edad a la que aparecen los síntomas:	(a) 1-60 años (b) 1er o 2º medio año de vida (c) 6-20 años
Genética:	(a), (b) y (c) en familias diferentes, todos recesivos.
Condición:	Enfermedad de Tay-Sachs (idiotismo infantil amaurótico familiar)
Acumulación de lípido:	Gangliósido GM ₂ (G ₀), aminoglicolípido
Lugar:	Materia blanca y gris del cerebro
Rasgos clínicos:	Mancha rojo-frambuesa, retina del ojo; degeneración cerebral progresiva; muerte a la edad de 1-5 años.
Edad a la que aparecen los síntomas:	Generalmente a los 4-6 meses, algunas veces antes
Genética:	Recesivo
Condición:	Idiotéz juvenil y adulta amaurótica familiar
Acumulación de lípido:	Gangliósido GM ₁ (G ₁)
Lugar:	Cerebro (moderadamente aumentado)
Rasgos clínicos:	Pérdida progresiva de la visión y degeneración cerebral.
Edad a la que aparecen los síntomas:	Desde los 5 años en adelante
Genética:	Probablemente recesivo
Condición:	Enfermedad de Neimann-Pick (a) Infantil aguda (b) Juvenil cerebral (c) No cerebral
Acumulación de lípido:	Principalmente esfingomielina
Lugar:	Bazo, médula ósea, hígado: generalmente también cerebro y retina
Rasgos clínicos:	A menudo mancha rojo frambuesa, retina del ojo; hepatoesplenomegalia; cirrosis hepática; generalmente degeneración cerebral y muerte en los primeros 2 ½ de vida. Algunos casos adultos son sin implicación neurológica.
Edad a la que aparecen los síntomas:	(a) Desde el nacimiento



los síntomas:	(b) Niñez (c) Hasta los 30 años o más
Genética:	(a) Recesivo (b) Recesivo (c) Incierto
Condición:	Leucodistrofia metacromática (a) Infantil (b) Adulta
Acumulación de lípido:	Sulfátidos
Lugar:	Cerebro, riñón, orina, vejiga
Rasgos clínicos:	(a) Degeneración cerebral y cerebelar; espasticidad; demencia; muerte después de 1-6 años. (b) Cambios psicóticos; ceguera; afasia; tetraplegia. Muerte después de los 3-12 años
Edad a la que aparecen los síntomas:	(a) 1-2 años (b) Niñez o edad adulta tardías.
Genética:	(a) Recesivo (b) Incierto
Condición:	Hiperlipidemia familiar esencial
Acumulación de lípido:	Triglicérido, lipoproteínas
Lugar:	Plasma sanguíneo (quilomicrones)
Rasgos clínicos:	Hepatoesplenomegalia; algunas veces xantomas
Edad a la que aparecen los síntomas:	Generalmente al comienzo de la niñez
Genética:	Complejo
Condición:	Hipercolesterolemia
Acumulación de lípido:	Colesterol (libre y esterificado), fosfátidos, algunas veces triglicéridos
Lugar:	Plasma sanguíneo (lipoproteínas), tendones, piel, vasos linfáticos
Rasgos clínicos:	Xantomas cutáneos y tendinosos; ateroma del endocardio, arterias coronarias o grandes vasos
Edad a la que aparecen los síntomas:	A partir de la niñez en adelante
Genética:	Generalmente dominante

Tabla 47-12. Métodos para el análisis de alfa1-antitripsina.

Método:	1. Electroforesis
Tipo de análisis:	Estimación de alfa1-globulinas por separación electroforética.
Principio:	La separación de las proteínas se basa en su migración en un campo eléctricamente cargado
Muestra:	Suero
Comentarios:	Útil en la detección de deficiencia severa de alfa1-



antitripsina.	
Método:	2. Capacidad inhibitoria de tripsina
Tipo de análisis:	Inhibición enzimática medida espectrofotométricamente
Principio:	La capacidad inhibitoria de tripsina de la alfa ₁ -antitripsina se determina espectrofotométricamente por la actividad estereolítica de la tripsina y su inhibición
Muestra:	Suero
Comentarios:	No utilizado frecuentemente
Método:	3. Nefelometría
Tipo de análisis:	Cuantificación por inmunoprecipitado en solución
Principio:	La reacción de la alfa ₁ -antitripsina con su anticuerpo específico resulta en inmunoprecipitado, el cual tiene propiedades ópticas; la cantidad de luz dispersada es proporcional a la concentración de alfa ₁ -antitripsina
Muestra:	Suero
Comentarios:	Método más comúnmente usado
Método:	4. Inmunodifusión radial
Tipo de análisis:	Cuantificación por inmunoprecipitado en gel
Principio:	La alfa ₁ -antitripsina difunde en un gel que contiene anticuerpo. Se forma un anillo de inmunoprecipitado; el diámetro del anillo es proporcional a la concentración
Muestra:	Suero
Comentarios:	No utilizado frecuentemente
Método:	5. Electroforesis de suero en gel de almidón seguida de electroforesis de antígeno-anticuerpo cruzado
Tipo de análisis:	Separación física de las variantes de alfa ₁ -antitripsina seguida por reacción por inmunoprecipitación en agarosa
Principio:	Procedimiento en dos pasos: 1. Separación de las variantes alfa ₁ -antripsina en gel de almidón por electroforesis 2. Una segunda electroforesis hace que las variantes searadas migren perpendicularmente hacia la primera separación en agarosa que contiene anticuerpo para alfa ₁ -antitripsina; se forma un pico de precipitina
Muestra:	Suero
Comentarios:	Consume mucho tiempo (1 ½ días) y es técnicamente dificultosa
Método:	6. Enfoque isoelectrico
Tipo de análisis:	Separación de las variantes alfa ₁ -antitripsina en gel de poliacrilamida basada en la propiedad de carga de superficie
Principio:	Las variantes de alfa ₁ -antitripsina son corridas en gel de poliacrilamida con un gradiente de pH desde 3.5 a 5 o desde 3 a 6
Muestra:	Suero
Comentarios:	Procedimiento más rápido, 4 horas; produce patrones de bandas similares a la electroforesis en gel de almidón



seguida por electroforesis de antígeno-anticuerpo cruzado

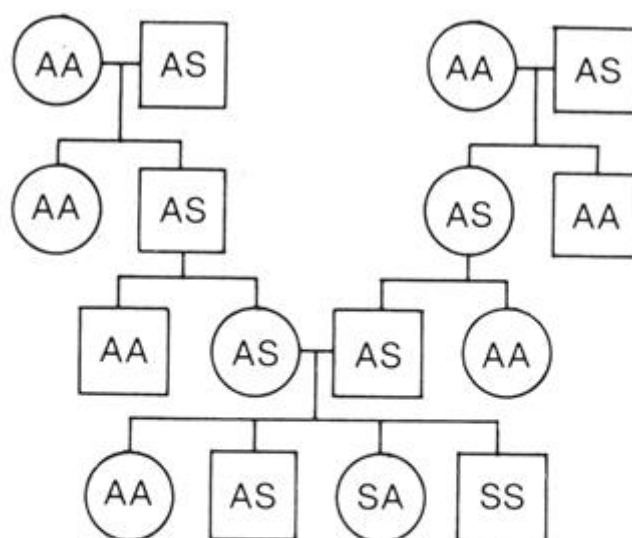
Tabla 47-13. Pruebas para carbohidratos comunes.

Método:	1. Prueba de Benedict modificado
Tipo de análisis:	Semicuantitativo
Principio:	El color es producido debido a la reacción de las sustancias reductoras con el reactivo que contiene sulfato de cobre, hidróxido de sodio, carbonato de sodio y ácido cítrico.
Uso:	Comúnmente usado
Comentario:	Detecta carbohidratos reductores.
Método:	2. Glucosa oxidasa
Tipo de análisis:	Semicuantitativo
Principio:	H ₂ O ₂ liberado de la oxidación de la glucosa por la glucosa oxidasa. El H ₂ O ₂ reacciona con cromógeno para formar un compuesto coloreado.
Uso:	Comúnmente usado
Comentario:	Específico para la glucosa
Método:	3. Cromatografía en papel.
Tipo de análisis:	Semicuantitativo
Principio:	Cromatografía ascendente o descendente; los azúcares se detectan después del desarrollo de color con ácido dinitrosalísílico o con reactivo de anilina-difenilamina.
Uso:	No utilizado frecuentemente
Comentario:	Buena sensibilidad y especificidad
Método:	4. Cromatografía en capa fina.
Tipo de análisis:	Semicuantitativo
Principio:	Desarrollo de color en una única dirección, con el reactivo de anilina-ácido ftálico.
Uso:	No usado frecuentemente
Comentario:	Buena sensibilidad y especificidad

Tabla 47-14. Métodos de análisis de ceruloplasmina.

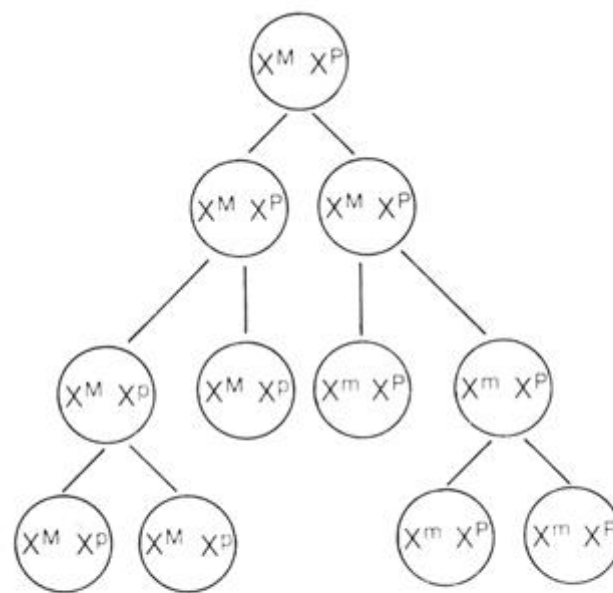
Método:	1. Colorimétrico
Principio:	La ceruloplasmina oxida al sustrato en presencia de oxígeno para formar un producto coloreado
Uso:	No usado frecuentemente en suero
Comentario:	Sujeto a variedad de interferencias
Método:	2. Inmunodifusión radial

Figura 47-1 Secuencia de sucesos a partir de un gen estructural que conduce a una función bioquímica específica y normal.



AA, homocigota para la hemoglobina A normal
AS, heterocigota para las hemoglobinas A y S
(portador de anemia falciforme)
SS, homocigota para la hemoglobina mutante S
(enfermo de anemia faciforme)

Figura 47-2 Pedigree que demuestra segregación de mutación en un único gen. El estado heterocigoto (portador de la enfermedad de célula falciforme en este ejemplo) es hereditario a partir de un único padre, mientras que el estado homocigoto (una persona afectada con la enfermedad de célula falciforme en este ejemplo) requiere de la herencia de un gen mutante a partir de cada padre.



X^M , cromosoma X activo derivado de la madre
 X^P , cromosoma X activo derivado del padre
 X^m , cromosoma X inactivo derivado de la madre
 X^p , cromosoma X inactivo derivado del padre

Figura 47-3 Inactivación al azar del cromosoma X en la mujer 46,XX. Una vez que un cromosoma X se inactiva, ese X particular es inactivado en todas las progenes subsecuentes de esa célula.

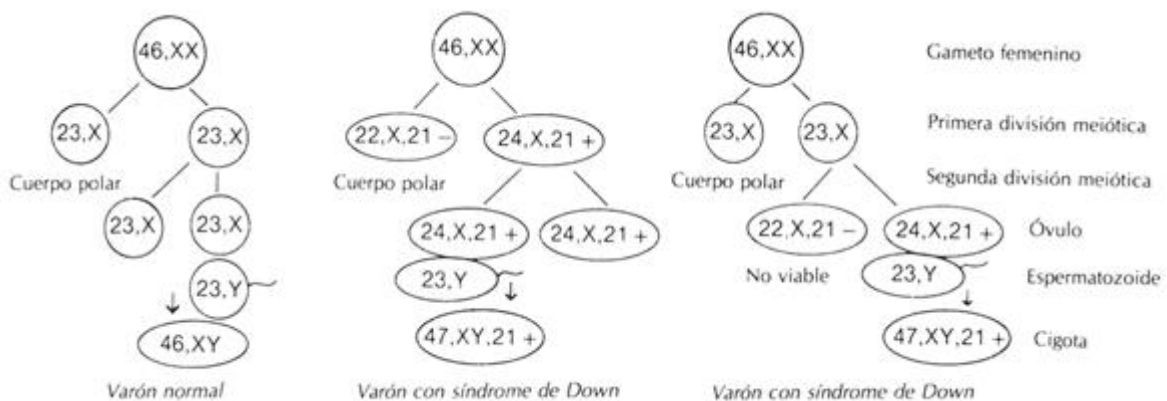


Figura 47-4 Nodisunción meiótica. *Izquierda*, Meiosis normal de un óvulo fertilizado por un espermatozoide normal produciendo un cigoto normal. *Centro*, Un error en la primera división celular de la meiosis resulta en un óvulo aneuploide que cuando es fertilizado produce un varón 47,XY,21+ varón con síndrome de Down. *Derecha*, Un error ocurrido en la segunda división de la meiosis con el mismo resultado.

	14, 21		
	t14/21	45,XX,t14/21	Portador
<i>Gametos</i>		<i>Cigotas</i>	<i>Fenotipo</i>
Óvulo	14, 21		
Espermatozoide	14, 21	46,XX	Normal
Óvulo	t14/21		
Espermatozoide	14, 21	45,XX,t14/21	Normal (portador)
Óvulo	t14/21,21		
Espermatozoide	14, 21	46,XX,t14/21	Síndrome de Down

Figura 47-5 Translocación 14/21. El portador tiene 45 cromosomas con un 14 normal, uno 21 y contenido genético de 14 y 21 en translocación. Una persona con síndrome de Down como resultado de tal translocación tiene dos 21s separados y un tercer 21 como parte de la translocación. Tal persona tiene un total de 46 cromosomas pero un contenido genético de tres números 21s, es decir, una trisomía 21.

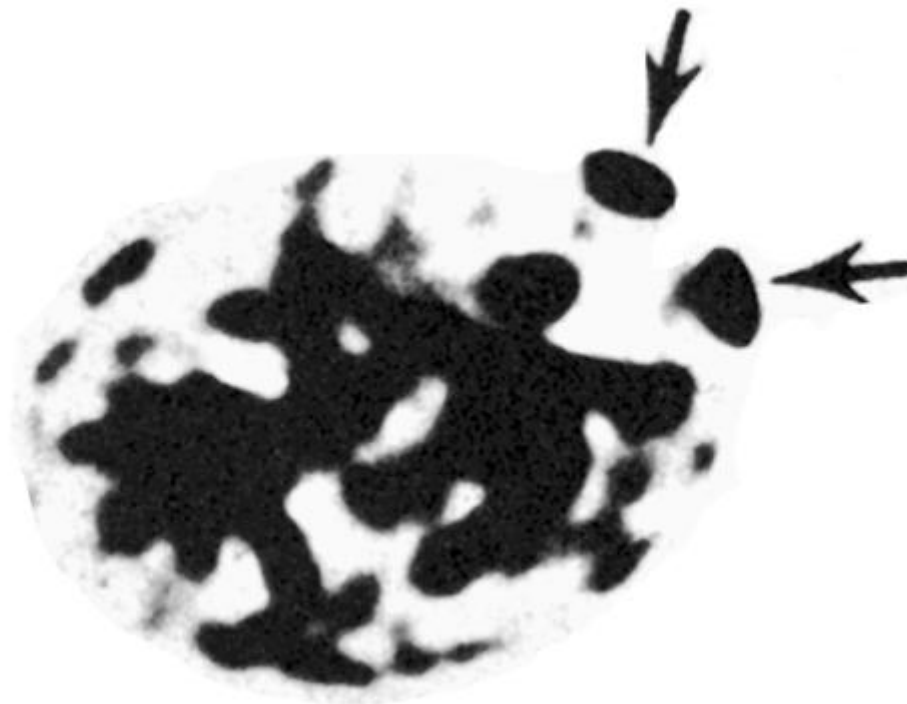


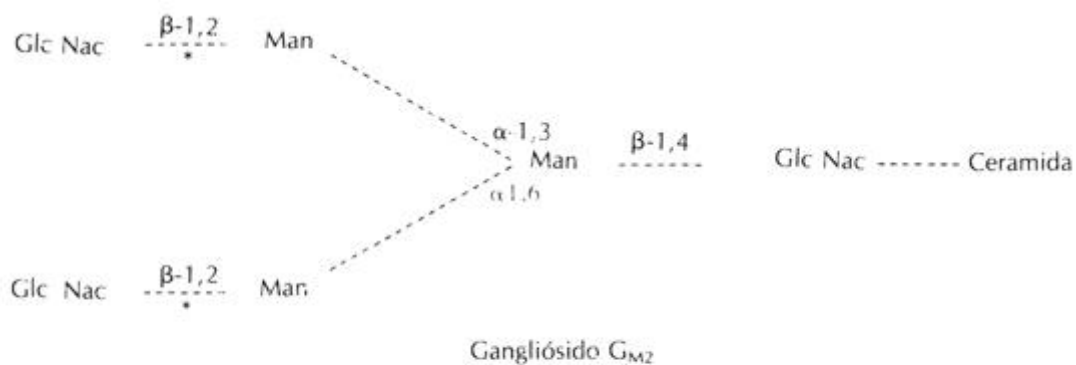
Figura 47-6 Corpúsculo de Barr. Esta célula tiene dos corpúsculos de Barr vistos como condensaciones nucleares justo dentro de la membrana nuclear en la posición de la hora 3 (*flecha*). Dos cuerpos de Barr serían vistos en un varón con 48, XXXY y en una mujer con 47,XXX.



Figura 47-7 Extensión de una metafase. Los cromosomas como se ven a través del microscopio en una técnica de coloración de la banda G.

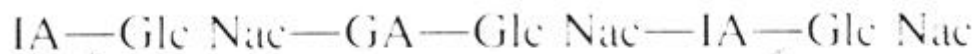


Figura 47-8 Cromosoma Filadelfia. Una extensión de la metafase con cromosomas bandeados muestra al pequeño número 22 o cromosoma Ph¹, y un cromosoma 22 normal + cromosoma 9 y cromosoma 9(ab) involucrados en la trranslocación 9/22 generando el cromosoma Ph¹.

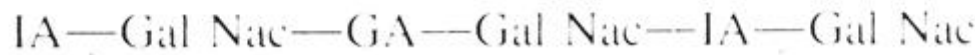


* La ruptura se produce por la acción de la hexosaminidasa A (N-acetil- β -1,2-glucosaminidasa).

Figura 47-9 La enfermedad de Tay-Sachs. El gangliósido G_{M2} se acumula en la materia gris del cerebro debido a la deficiencia de N-acetil-(1,2-glucosaminidasa (hexosaminidasa A). Glc Nac, N-acetilglucosamina; Man, manosa.



Sulfato de dermatina



Sulfato de heparina

* Sitio de hidrólisis llevada a cabo por la α -L-iduronidasa en la cadena oligosacáridica del sulfato de dermatina y sulfato de heparina.

Figura 47-10 Síndrome de Hurler. La deficiencia de la hidrolasa lisosomal α -L-iduronidasa resulta en una amplia acumulación tanto de heparansulfato como de dermatansulfato. GA, Glucosamina; Gal Nac, N-acetilgalactosa; Glc Nac, N-acetilglucosamina; IA, ácido idurónico.

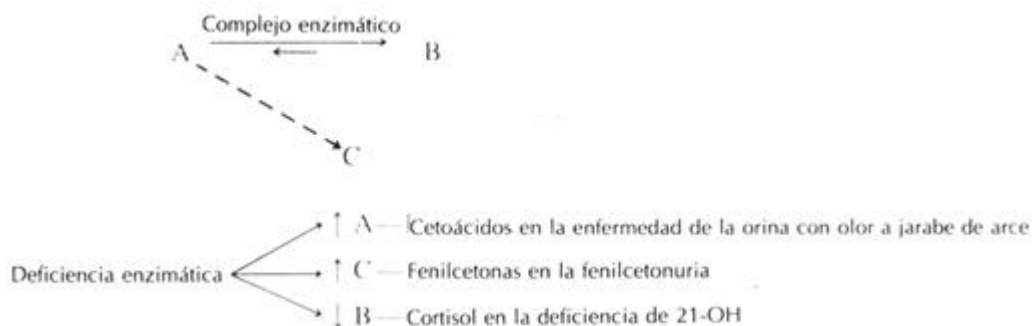


Figura 47-11 Deficiencia de enzima. La deficiencia de una enzima en una vía metabólica puede producir síntomas clínicos debido a la acumulación de sustrato, A; falta de producción de producto, B; o desviación de sustrato a una vía alternativa con la producción de un compuesto tóxico, C.

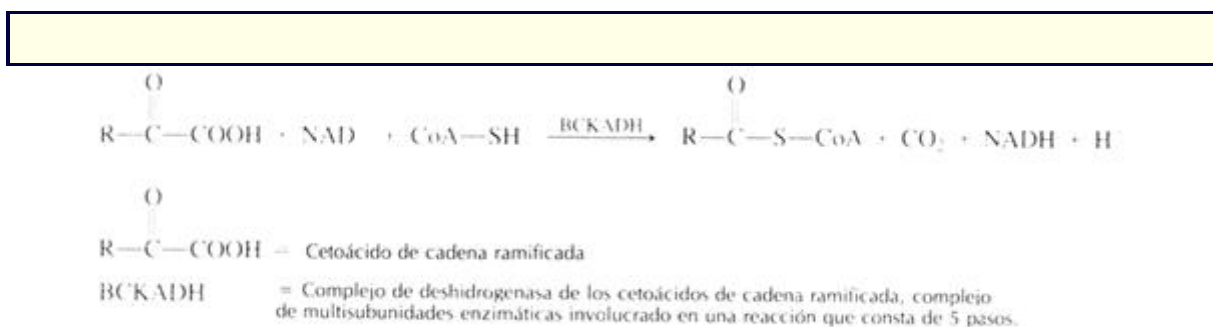


Figura 47-12 Enfermedad de la orina de tipo jarabe. Cuando es deficiente el complejo de la enzima decarboxilasa de cetoácido ramificado resulta en un aumento de los aminoácidos ramificados valina, isoleucina, y leucina, así como sus cetoácidos análogos.

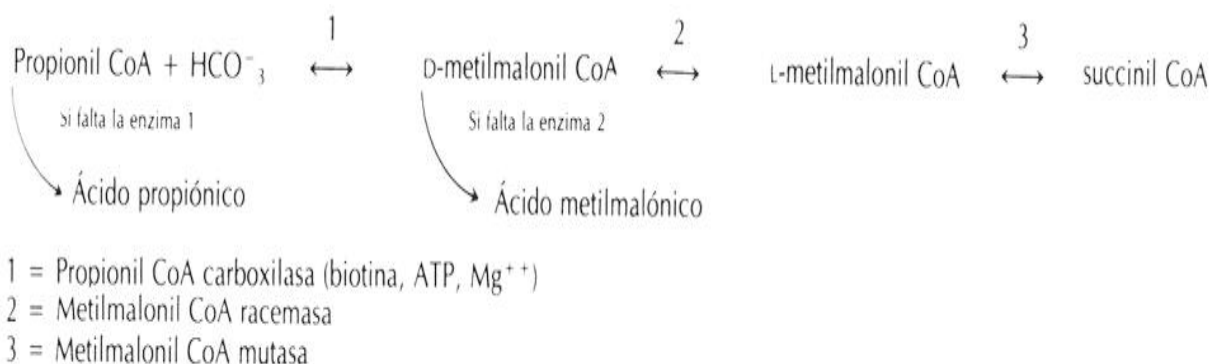


Figura 47-13 Aciduria propiónica y aciduria metilmalónica. Esta secuencia del metabolismo de los ácidos orgánicos puede ser interrumpida en varios puntos, cada uno de los cuales resulta en una aciduria orgánica específica.

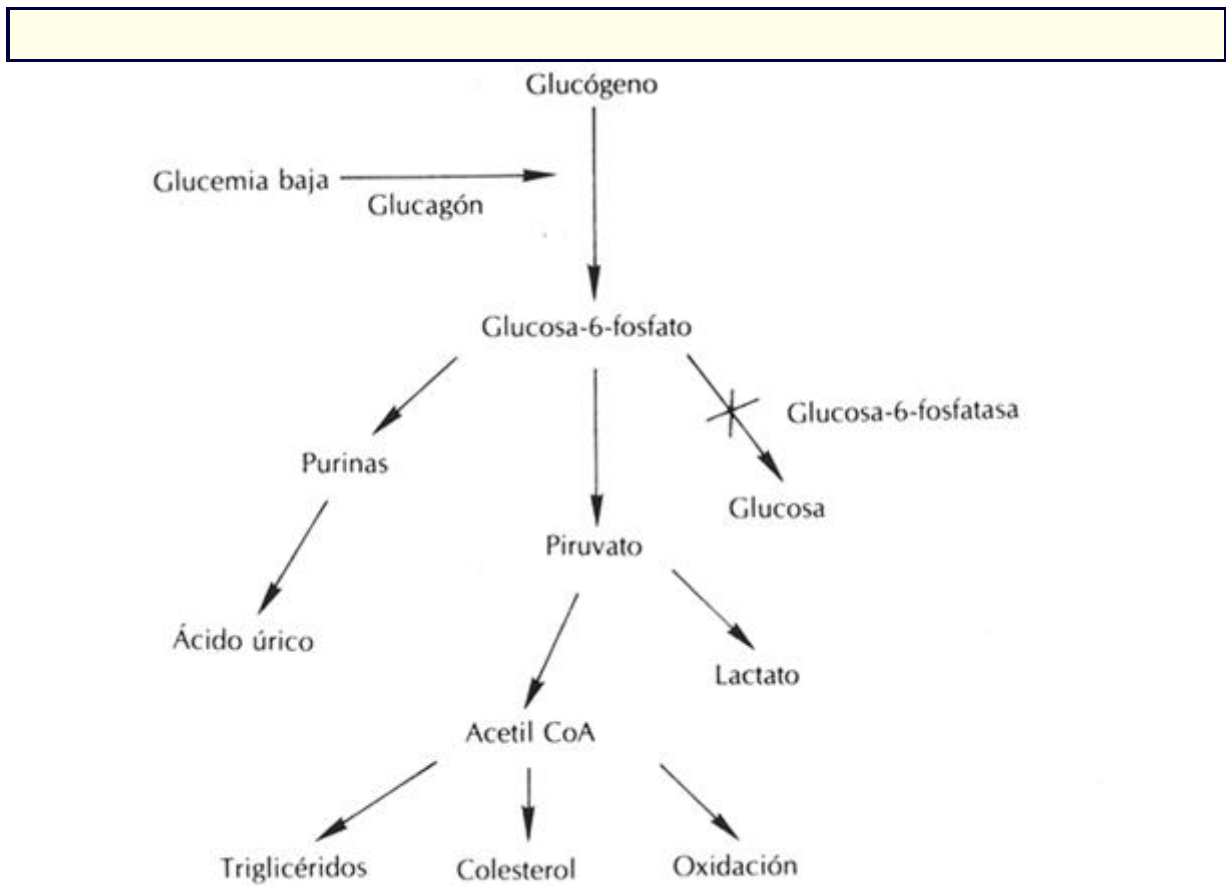


Figura 47-14 Enfermedad de almacenamiento de glucógeno tipo 1 (enfermedad de von Gierke). El uso de glucógeno para formar glucosa libre requiere de una acción hepática de la glucosa-6-fosfatasa para transportar la glucosa extracelularmente.

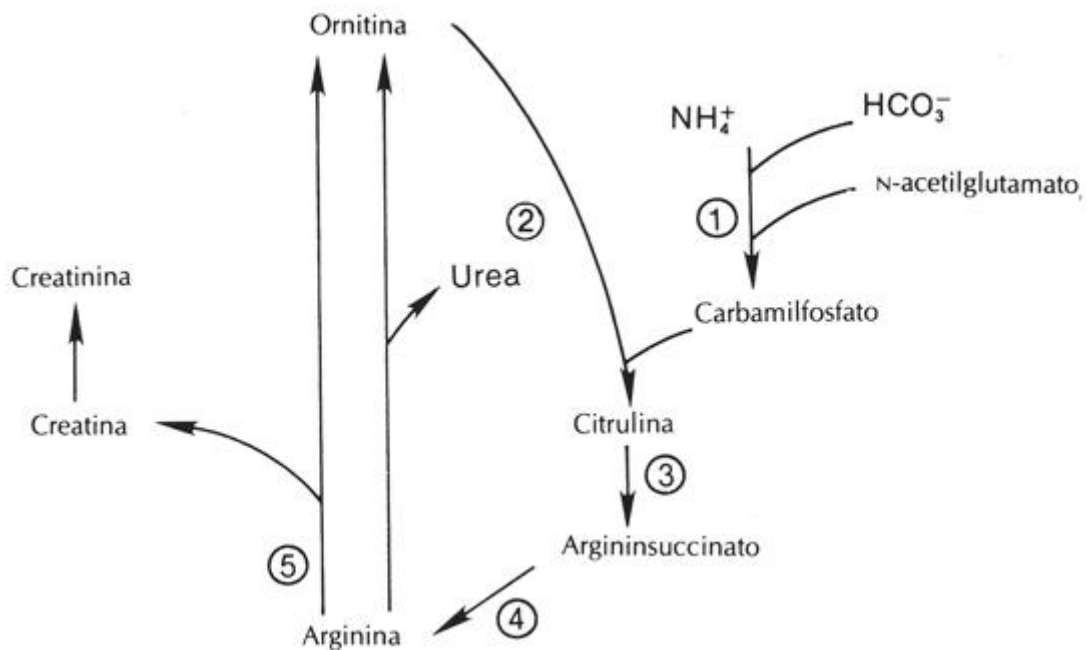




Figura 47-15 Defectos del ciclo de la urea. Cinco hiperamonemias primarias incluyen tipo 1, o deficiencia de la carbamil fosfato sintetasa; tipo 2, o deficiencia de la ornitina transcarbamiltransferasa; tipo 3, o citrulinemia causada por la deficiencia de la argininosuccinato sintetasa; tipo 4; o argininosuccinicacidura causada por la deficiencia de la argininosuccinasa; tipo 5, o hiperargininemia causada por deficiencia en la arginasa.

CAPÍTULO 48

48. Biología Molecular en el Laboratorio Clínico.

W. Edward Highsmith, Jr.

Jay Stoerker

Lawrence M. Silverman

Material genético

- Composición química y estructura del DNA

- Mutaciones y expresión genética

Técnicas de análisis del DNA

- Técnicas generales

 - Digestión restrictiva y electroforesis en gel

 - Transferencia Southern

 - Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

- Técnicas para desórdenes genéticos

 - Análisis directos

 - Limitaciones del análisis directo

 - Análisis indirectos

Aplicaciones clínicas de las técnicas moleculares

- Cáncer

 - Oncogenes

 - Genes supresores tumorales

 - Síndromes de cánceres familiares

 - Cánceres esporádicos

- Enfermedades infecciosas

- Desórdenes genéticos

Diagnóstico prenatal

Factores que afectan las pruebas genéticas para desórdenes genéticos

Caso ilustrativo: fibrosis quística

- Antecedentes clínicos

- Opciones para las pruebas genéticas

- Reporte de un caso

OBJETIVOS

- Revisar la estructura del DNA, y describir la forma en que algunas propiedades como el apareamiento de bases complementarias y la digestión por nucleasas específicas pueden ser utilizadas para identificar secuencias específicas de DNA.
- Enumerar los principales usos clínicos de las técnicas para identificar secuencias específicas de DNA.
- Describir los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción y el número variable de repeticiones en tándem, y explicar cómo pueden usarse para detectar la presencia de genes específicos.
- Describir la técnica de Southern blot.
- Describir la reacción en cadena de la polimerasa

Términos clave

apareamiento de bases Proceso por el cual las bases purinas y pirimidinas se unen a través de puentes de hidrógeno. Las bases se aparean de forma complementaria y específica: adenina con timina (o uracilo) y guanina con citosina.

desnaturalización Proceso por el cual el ácido nucleico doble cadena se separa para formar hebras simples. Se puede lograr la desnaturalización por calor, sales o sustancias químicas. También se le denomina *fusión*.

ADN complementario (cADN) Copia de ADN de una molécula de mRNA. Preparada mediante la transcriptasa reversa, usando el mRNA como molde.

ADN de cadena doble Dos cadenas complementarias de ADN unidas por puentes de hidrógeno.

ADN de cadena simple Porción de ADN que no está apareado a su cadena complementaria.

endonucleasas de restricción Tipo de nucleasas (generalmente bacterianas) que reconocen secuencias de bases específicas dentro de la cadena de ADN y lo cortan.

gen La unidad biológica hereditaria más pequeña, ubicada en sitios específicos en cromosomas específicos. Un gen contiene la información que codifica para una proteína específica.

hibridación Proceso por el cual las cadenas simples complementarias de ácido nucleico forman complejos de doble cadena a través del apareamiento de bases.

ligamiento Término que define la asociación de genes en un cromosoma con secuencias específicas de ADN.

polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (PLFR) Diferencias hereditarias en los patrones de digestión restrictiva, observados cuando un polimorfismo de secuencia del ADN, crea o destruye un sitio de reconocimiento para una enzima de restricción. Los PLFR pueden observarse mediante ensayos de PCR o transferencia Southern.

reacción en cadena de la polimerasa (PCR) Método *in vivo*, dirigido por un oligonucleótido para la rápida amplificación de secuencias específicas de ADN. En este texto se utilizará la abreviatura inglesa PCR por “polimerase chain reaction” para referirse a esta técnica.

rigurosidad Condiciones bajo las cuales se lleva a cabo un experimento de hibridación. Las condiciones de alta rigurosidad (baja fuerza iónica, temperatura cercana a la de fusión del ADN) permiten solamente la hibridación de hebras con apareamiento perfecto de bases. Las condiciones de baja rigurosidad (alta fuerza iónica y temperatura menor a la de fusión del ADN) permiten la hibridación de hebras homólogas pero no perfectamente apareadas.



secuencia de bases Es el orden exacto de bases púricas (guanina y adenina) y pirimidínicas (citosina y timina o uracilo) encontradas en los ácidos nucleicos. El orden define la secuencia primaria de aminoácidos de los productos génicos, que son las proteínas.

sitio de restricción Secuencia de bases reconocida y cortada por una enzima de restricción particular.

sonda Secuencia de ADN o RNA complementaria marcada con algún radioisótopo, enzima u otro marcador.

temperatura de fusión Temperatura a la cual la mitad de una población de especies de ADN idénticas existe en forma de cadena doble y la otra mitad en forma de cadena simple (desnaturalizada). La temperatura de fusión depende de la fuerza iónica de la solución, de la longitud de las cadenas de ADN, y del porcentaje de (G+C) del ADN.

transferencia Northern Proceso similar a la transferencia Southern, con la diferencia de que la molécula transferida y analizada es RNA.

transferencia Southern Proceso por el cual el ADN electroforéticamente separado y desnaturalizado es transferido desde el gel electroforético (usualmente de agarosa) a un filtro o membrana de nitrocelulosa para subsiguientes análisis de hibridación

La unidad hereditaria más pequeña, el *gen*, codifica para cadenas proteicas específicas, cada una con una función específica en la fisiología celular. Químicamente, los genes están generalmente compuestos por ácido desoxirribonucleico (ADN, ver adelante). Las secuencias de bases están agrupadas en unidades informacionales de tres bases, llamadas *codones*. Cada secuencia en triplete que compone un codón, puede o bien codificar para un aminoácido específico o servir para una función reguladora, como la de detener o empezar la síntesis proteica. Estructuralmente, la secuencia de bases que compone un gen está ligada a otros genes, a secuencias reguladoras, y a secuencias de ADN sin función aparente. El ADN está asociado con un gran número de proteínas que cumplen funciones reguladoras, y que también sirven para empaquetar el material genético en unidades más grandes llamadas *cromosomas*.

A medida que aumenta el número de genes identificados e implicados en varias enfermedades humanas, el laboratorio clínico se enfrenta a nuevos desafíos. Sabemos que pueden ocurrir enfermedades o estados anormales, que ocurren cuando los genes son dañados, y que este daño generalmente resulta de cambios químicos en los genes, llamados *mutaciones* (ver adelante). Actualmente, el laboratorio utiliza las técnicas y la tecnología de la biología molecular para identificar y caracterizar mutaciones génicas específicas asociadas con desórdenes en un único gen como la fibrosis quística o la distrofia muscular Duchenne, así como con desórdenes poligénicos, como el cáncer o la aterosclerosis. Además, las técnicas moleculares son ampliamente utilizadas en la detección de agentes infecciosos, incluyendo organismos que son difíciles de cultivar o que están presentes en bajo número.

Este capítulo introduce el uso de estas técnicas en el laboratorio clínico para la detección y caracterización de desórdenes en un solo gen. También se discuten la aplicabilidad de estas técnicas para la detección de enfermedades infecciosas y del cáncer.

Material Genético

Composición química y estructura del ADN

La Fig. 48-1 muestra el arreglo único de azúcar, fosfato, y bases purinas y pirimidinas que forma la estructura de doble hélice conocida como ADN. El ADN generalmente consiste en dos hebras de secuencias de bases unidas entre sí por puentes de hidrógeno entre las bases de cada hebra simple de ADN (Fig. 48-1). Las bases se unen entre sí, de forma específica o *complementaria*. La adenina se une a timina, mientras que guanina se une a citosina. Por lo tanto, una cadena de ADN de doble cadena tiene una secuencia de bases que es complementaria a la de la otra cadena. Una cadena simple de ADN se unirá a otra cadena simple de ADN si las cadenas contienen una alta proporción de secuencias complementarias. Por ejemplo, si una mezcla consiste en cadenas simples de ADN-A y de su cadena complementaria, así como de un exceso de otras hebras de ADN no complementarias, entonces la cadena A solo formará complejos de doble cadena con su cadena complementaria y con ninguna otra. En el laboratorio, el proceso en el que se permite que cadenas simples de ADN complementarias formen ADN de doble cadena, es llamado *hibridación*. La hibridación también puede realizarse entre cadenas simples de ADN y cadenas complementarias de ácido ribonucleico (RNA). Para la medición de una secuencia específica de bases de ADN, se prepara una copia de esa secuencia de bases. Esta copia de ADN complementario (c-ADN), conocida como sonda de ADN, es marcada de alguna forma para permitir el monitoreo de la reacción de hibridación. Las bases de las técnicas que se explican más adelante en este capítulo giran alrededor de las propiedades de hibridación de una secuencia de bases específica que constituye una hebra simple de la hélice de ADN doble hebra.

Mutaciones y expresión génica

Una mutación genética es un cambio estable en la estructura del ADN que generalmente provoca un cambio en la secuencia de bases que componen un codón. El cambio de bases por lo general cambia el código de la información contenida en ese código. Una mutación que tiene lugar en la porción de ADN que codifica para una proteína, usualmente provoca un cambio en la estructura de aminoácidos de la proteína. Este cambio puede no producir cambio alguno en la función de la proteína, aunque también puede ocasionar una pérdida total o parcial de su función. Es la pérdida parcial o total de la función, la que usualmente genera el estado patológico. El efecto de una pérdida de función puede ser directo, como en la disfunción conformacional de la hemoglobina, que resulta en la enfermedad conocida como anemia falciforme (ver capítulo 36), o indirecta, como es la pérdida de función de reguladores de la expresión génica que puede terminar en un cáncer (ver pág. 976 y capítulo 49).

Las mutaciones pueden ocurrir por una amplia variedad de mecanismos. Para propósitos de la discusión sobre cáncer y enfermedades hereditarias, las mutaciones pueden dividirse en eventos germinales o somáticos. Una mutación germinal, es aquella que está presente en todas las células del cuerpo, y que es transmitida de generación en generación por meiosis (creación de células germinales – espermatozoides y óvulos) y reproducción sexual. Las mutaciones somáticas son aquellas que surgen en tejidos celulares, generalmente como resultado de alguna agresión del medio externo o de un error en la replicación del ADN. Para información adicional sobre herencia genética, ver el capítulo 47.

La expresión génica anormal también puede deberse a cambios hereditarios en la estructura química de los genes que no sean resultado del cambio de una base de un codón. La metilación de las bases nucleotídicas es una modificación postsintética del ADN que afecta la expresión de los genes. Los patrones anormales de metilación de ADN pueden provocar



expresiones génicas anormales (transcripción) y estados de enfermedad. A lo largo del ADN, existen secuencias de bases repetidas que no tienen ninguna información aparente con respecto a la estructura proteica. Se ha asociado la expansión del número de repeticiones en un gen con enfermedades específicas, y este cambio en la estructura del gen es hereditario (ver pág. 975).

Técnicas de Análisis del DNA

Varias tecnologías fundamentales son de importancia pivotal para la práctica moderna de la biología molecular. La primera toma ventaja de la capacidad de las hebras complementarias de ADN de encontrarse una a la otra en una solución que contenga una mezcla de ADN, y de unirse para formar la doble hélice de ADN. A esta técnica de unión específica se le llama hibridación y es la base de prácticamente todos los tipos de métodos de detección de ADN. El segundo tipo de técnicas cruciales para la manipulación y detección de secuencias nucleotídicas específicas involucra a un gran número de enzimas que están disponibles comercialmente. Estas endonucleasas de restricción, que *in vivo* están involucradas en el metabolismo y reparación del ADN o en la defensa del huésped bacteriano, proveen las herramientas moleculares con las que los ácidos nucleicos pueden ser manipulados con extraordinaria especificidad.

El tercer tipo de técnicas fundamentales de la biología molecular moderna son los métodos de detección. Estos métodos poseen extraordinaria especificidad, no por la estructura química del ADN, que es idéntica para todos los genes, sino por la secuencia de bases, que determina la información que lleva una porción particular de ADN. Además, debido a que las secuencias génicas específicas solo constituyen una diminuta fracción del genoma humano total y en virtud de que normalmente sólo se dispone de cantidades de ADN del orden de microgramos, estos métodos deben tener una sensibilidad extrema. El primero de estos métodos en ser descrito y ampliamente adoptado es la transferencia southern. El segundo es la reacción en cadena de la polimerasa.

Técnicas generales

Digestión restrictiva y electroforesis en gel.

Una propiedad específica del ADN (y RNA) es su susceptibilidad a enzimas llamadas *nucleasas*. Las nucleasas hidrolizan los puentes fosfodiéster que unen las bases dentro de una cadena de ácido nucleico, provocando la ruptura de dicha cadena. Algunas nucleasas tienen una especificidad muy alta por su sustrato y cortan la hebra de ADN solo en secuencias de bases específicas, a menudo tan pequeñas como 4 a 8 bases de longitud. Se llaman *endonucleasas de restricción* debido a que estas nucleasas son utilizadas por las bacterias para restringir la entrada de ADN extraño a sus células. Las secuencias reconocidas y cortadas por las enzimas se llaman *sitios de restricción*. Estas enzimas requieren del ion Mg^{++} para su actividad. Se han identificado más de 400 enzimas que reconocen diferentes sitios de restricción. La mayoría de ellas está disponible comercialmente.

Las endonucleasas de restricción son reactivos críticos en cualquier laboratorio que investigue secuencias de bases de ADN porque rompen el ácido nucleico de doble hebra solo en puntos específicos. Luego que estas endonucleasas degradan el ADN en varios fragmentos más pequeños, pueden ser identificadas fácilmente secuencias de bases específicas con la técnica de hibridación. Para identificar una secuencia de bases específica, primero se pueden



separar los fragmentos de acuerdo al tamaño molecular. Esto se logra por electroforesis ya sea en gel de agarosa o poliacrilamida (o sus derivados).

El método más común para la visualización del ADN luego de la separación electroforética por tamaño es por tinción con el agente intercalante bromuro de etidio. Cuando este compuesto se encuentra en solución, está libre para perder la energía adquirida de la radiación incidente, aumentando la colisión y la rotación con las moléculas de solvente. Sin embargo, cuando una molécula de bromuro de etidio se intercala en la doble hélice de ADN, estos movimientos se pierden y la molécula se libera del exceso de energía a través de la fluorescencia. Los fragmentos de ADN generados por digestión con enzimas de restricción se encuentran en concentraciones molares iguales entre sí, lo que proporciona un método fácil para determinar que se haya completado una determinada reacción de digestión restrictiva. La hibridación de los fragmentos separados se logra por la técnica de transferencia Southern.

Transferencia Southern

Se colectan las muestras sanguíneas para análisis de ligamiento, en tubos con el anticoagulante ácido-citrato-dextrosa (AC), para luego aislar, de cada muestra, las células blancas. Se extrae el ADN de las células blancas y se incuba con una endonucleasa de restricción para romper el ADN en fragmentos más pequeños. Se carga la muestra de ADN digerido en un gel de agarosa y se corre una electroforesis para separar los fragmentos de acuerdo al tamaño. Los fragmentos son tratados posteriormente con químicos o temperaturas elevadas, para separar el ADN de cadena doble en cadenas simples; a este proceso se le llama *desnaturalización*. Después, los fragmentos separados y desnaturalizados son transferidos (por electrotransferencia o electroforesis) desde el gel a otro soporte, como es la nitrocelulosa o la membrana de nylon (transferencia southern). El o los fragmentos que contiene la secuencia de ADN de interés son identificados por incubación de la membrana con una sonda de ADN marcada que contiene secuencias complementarias a la secuencia de interés. El marcador puede ser un radioisótopo, una enzima o un colorante fluorescente. La secuencia complementaria de la sonda le permite hibridarse al ADN de la muestra que contiene las secuencias deseadas. En el caso de c-ADN marcado radiactivamente, la membrana se incuba con una *película* de rayos X, en donde quedan expuestas las áreas (bandas) en las que la sonda se unió al ADN de la muestra, obteniéndose un *autorradiograma* (Fig. 48-2).

El procedimiento descrito requiere de 7 a 10 días desde la extracción de ADN de la sangre hasta el revelado del autorradiograma. Por lo general, el ADN es extraído en el primer día, digerido con enzimas de restricción en el segundo día, separado electroforéticamente en el día 3 durante toda la noche e hibridado en los días 4 y 5. Luego se coloca la membrana dentro de un cassette de rayos X con la película de rayos X durante 1 a 4 días para finalmente revelar. Alternativamente, cada vez tienen mayor popularidad los métodos de detección no isotópicos que utilizan detección colorimétrica o luminiscente, debido a que reducen el tiempo requerido para la visualización de las bandas, así como la exposición del analista a la radiación ionizante. Estos métodos utilizan un segundo paso de incubación con un anticuerpo conjugado a una enzima que reconoce un hapteno que ha sido incorporado en la sonda de ADN, en lugar del ^{32}P . La acción de la enzima genera un producto coloreado o quimioluminiscente a partir de un sustrato incoloro o inactivo. Hay varios sistemas de detección no isotópicos para transferencias southern disponibles comercialmente, algunos ejemplos son: el estuche



GENIUS de Boehringer-Mannheim (colorimétrico) y el sistema ECL de Amersham (quimioluminiscente).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Aunque la técnica de transferencia Southern combina una sensibilidad razonable, con una excelente especificidad, es técnicamente exigente; típicamente requiere el uso de emisores de partículas β , de alta energía y por tanto peligrosos, como el ^{32}P , y lleva mucho tiempo realizarla. Varias de las desventajas que presenta la técnica de Southern pueden eliminarse al usar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La PCR es una técnica desarrollada para la rápida amplificación *in vitro* de secuencias específicas de ADN.

Para la técnica de PCR, es necesario conocer previamente la secuencia de la región de ADN que flanquea el área de interés. Se preparan (o compran) dos oligodesoxinucleótidos sintéticos (cebadores) de 20 a 30 bases de longitud, de modo que uno de los cebadores sea complementario a una región en una cadena del ADN blanco que esté en el extremo 5' (ver Fig. 48-1 para una descripción de los extremos 5' y 3' de una hebra de ADN) de las secuencias a ser amplificadas, y que el otro cebador sea complementario de la otra hebra del ADN blanco, y también 5' de la región a ser amplificada. En la Fig. 48-3 se muestra un esquema.

Para llevar a cabo la amplificación, se coloca el ADN muestra en un tubo, junto con un gran exceso molar de cebadores, los cuatro deoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs), amortiguador, ion magnesio, y una ADN polimerasa termoestable. La polimerasa que se utiliza más comúnmente se purifica del organismo termofílico *Thermus aquaticus*. Esta enzima, llamada *Taq* polimerasa, tiene su actividad óptima a 72° C, aunque puede sobrevivir por períodos cortos a temperaturas tan altas como 95° C, sin que se desnaturalice irreversiblemente. La mezcla de reacción primero se calienta a 95° C para desnaturalizar, o fundir, el ADN de la muestra de su forma de doble cadena a la forma de cadena simple. Luego se disminuye la temperatura, generalmente hasta 50 o 60° C para permitir la reasociación, o hibridación, de los cebadores a sus sitios complementarios en el ADN de la muestra de cadena simple. Es necesario señalar que el gran exceso molar de los cebadores, así como su pequeño tamaño, asegurará que la hibridación se realice entre el ADN de la muestra y los cebadores y no entre las dos hebras de ADN de la muestra. La temperatura se incrementa, luego, a 72° C, la temperatura óptima de la *Taq* polimerasa. La polimerasa extiende los cebadores en la dirección 5' a 3', incorporando los dNTPs en las cadenas complementarias de ADN, en crecimiento. Es crucial que la polimerasa se extienda lo suficientemente lejos en cada cadena para crear un nuevo sitio de unión para el cebador opuesto. Luego de mantener la temperatura en 72° C por un período de tiempo suficiente como para sintetizar una nueva hebra de ADN desde un cebador hasta el sitio de unión del segundo cebador (generalmente 15 a 60 segundos), se repite el proceso cíclico de cambiar de la temperatura. Después del calentamiento para desnaturalizar el ADN recientemente formado, la temperatura se disminuye nuevamente para permitir la adhesión de los cebadores, esta vez tanto en los sitios de unión de las cadenas nuevas, como en las cadenas originales. La temperatura es nuevamente incrementada a 72° C para extender los cuatro cebadores unidos (Fig. 48-3). A medida que se repiten los cambios de temperatura, se sintetiza el ADN entre los dos cebadores. La cantidad de ADN producido es exponencial con respecto al número de ciclos. Luego de 20 ciclos de adhesión, extensión y desnaturalización, se habrán generado 2^{20} o aproximadamente 10^6



copias.

En un experimento típico que inicie con una cantidad de ADN humano entre 100 y 1000 ng, luego de 30 ciclos de amplificación se producirá suficiente ADN específico como para ser visualizado en un gel teñido con bromuro de etidio. Dado que cada ciclo demora 2 a 5 minutos, la amplificación de una secuencia específica puede lograrse fácilmente en varias horas. Después de la amplificación, el ADN puede ser analizado por alguna técnica, dependiendo del problema específico.

Técnicas para desórdenes genéticos

Análisis directo

Muchas de las pruebas de laboratorio utilizadas en el diagnóstico de desórdenes genéticos proporcionan resultados que pueden ser característicos de un desorden particular, pero que no son enteramente específicos. Estas pruebas generalmente son de tipo *fenotípicas*; es decir, reflejan la expresión de un gen particular, pero no la secuencia de ADN exacta o *genotipo*. Por lo tanto, las pruebas fenotípicas pueden llevar a equivocaciones, particularmente en la ausencia de datos clínicos completos y de la historia familiar. Las pruebas *directas* o *genotípicas*, pueden evitar estos problemas, ya que detectan las alteraciones específicas en el ADN que dan lugar al desorden. Se han desarrollado varias técnicas para la detección directa de mutaciones conocidas, basadas principalmente en la PCR. A continuación se da una breve explicación de algunas de las técnicas más comúnmente usadas.

Hibridación de oligonucleótidos específicos para el alelo (OEA o transferencia en mancha). Se amplifica el ADN por PCR y se coloca en dos membranas de nylon. Luego se hibridiza cada membrana, con uno de los dos oligonucleótidos (oligo) sintéticos, radiomarcados, que abarcan la región de ADN que contiene una mutación específica. Un oligo tiene la secuencia complementaria a la del *tipo silvestre* o secuencia normal de ADN, mientras que el otro es perfectamente complementario al alelo mutante. Bajo condiciones apropiadas de temperatura y concentración salina (rigurosidad) la hibridación ocurrirá solo cuando la sonda y el ADN blanco se apareen perfectamente. Por lo tanto, el oligo normal solo se unirá a la secuencia blanco amplificada normal, mientras que el oligo mutante solo se hibridará con el alelo mutante. La detección, en general, es por autorradiografía. Algunas variantes de este procedimiento incluyen la detección no isotópica y la hibridación en placas de microvaloración en lugar de ser en una membrana.

Transferencia en mancha inversa. La transferencia en mancha inversa es una variante de la técnica OEA en la cual los oligonucleótidos alelo específicos (normal y mutante) se adhieren a una membrana de nylon. Se realiza la amplificación del ADN de la muestra en la forma usual pero con uno de los dos cebadores de la PCR marcado en el extremo 5' con una molécula de biotina. El ADN amplificado se hibridiza con los OEAs en la membrana, bajo las condiciones adecuadas de rigurosidad para la hibridación específica del alelo. Luego de los pasos de hibridación y lavado, moléculas de avidina conjugada a fosfatasa alcalina se unen a la biotina. La detección de los híbridos se realiza por monitoreo de la acción de la enzima sobre un sustrato para producir un producto coloreado e insoluble. Este sistema de detección está disponible comercialmente para determinar el genotipo HLA.

PCR específica del alelo (PCR-EA). Con este método de PCR específica del alelo, también llamada *detección de mutaciones resistentes a la amplificación*, se preparan tres



cebadores. Uno de ellos, el cebador constante, está entre 100 y 200 bases alejado del sitio de la mutación. Dos de los cebadores se traslapan en una base en el sitio de la mutación en el extremo 3' del cebador. El oligo normal es complementario a la secuencia normal, y el oligo mutante es complementario a la secuencia mutante. Se realizan dos reacciones de amplificación, cada una con el cebador normal o mutante y con el constante. Solamente ocurrirá la amplificación cuando los cebadores estén perfectamente apareados en el extremo 3'.

Análisis de restricción. Ocasionalmente, una mutación causal de enfermedad puede crear o destruir un sitio de reconocimiento para una enzima de restricción. El ejemplo clásico es la anemia falciforme. En este caso, la mutación que reemplaza A por T elimina un sitio de restricción para la enzima *Mst II*. Por lo tanto, la detección consiste en la amplificación por PCR de la región del gen de la β -globina que contiene el codón 6, digestión con *Mst II*, y determinación del tamaño de los fragmentos de PCR luego de una electroforesis. En presencia de controles adecuados, la incapacidad de la enzima de cortar el ADN amplificado por PCR en dos fragmentos más pequeños, revela la presencia de esta mutación específica.

Mutagénesis dirigida a un sitio, mediada por PCR (MSP). Cuando una mutación que causa una enfermedad no crea o destruye un sitio de restricción, se puede crear uno que sea específico del alelo silvestre o del mutante, usando un cebador que esté 100 a 200 bases alejado del sitio de la mutación y que colinde con el sitio de la mutación pero que no se traslape con éste. Introduciendo una base no complementaria en este cebador colindante, la secuencia del material amplificado luego de la PCR se verá alterada, de forma de contener la base cambiada que estaba presente en el cebador, y no la que estaba presente en el blanco (esto es la mutagénesis dirigida a un sitio). Al introducir una mutación puntual ubicada varias a varias bases de distancia de la mutación, a menudo es posible introducir un sitio de restricción que esté asociado tanto con la secuencia del tipo silvestre como con la secuencia mutante, pero no con ambas. Luego de la PCR y la digestión restrictiva, se identifican los alelos por sus diferentes longitudes en una electroforesis en gel.

Limitaciones del análisis directo.

Es impresionante el número de enfermedades en las cuales se han identificado mutaciones en un único gen, en los últimos 5 años. Teóricamente, se podrían desarrollar pruebas directas para todos estos desórdenes. A pesar de que se dispone de pruebas para muchos de ellos, la *heterogeneidad genética* impide el uso de unas cuantas pruebas simples para el diagnóstico de estados de enfermedad o para la detección de portadores en todos los pacientes o familias. La heterogeneidad genética se refiere a la observación de que a pesar de que en general un desorden clínico es causado, por una mutación en un gen único, el rango de mutaciones en ese gen capaz de causar la enfermedad es muy grande. Esta heterogeneidad genética se refleja por una heterogeneidad fenotípica, es decir, en un amplio grado de severidad de la misma enfermedad. La excepción a esta regla es la anemia falciforme. Cada caso de anemia falciforme se debe a la misma mutación, una mutación A por T en el codón 6 del gen de la β -globina. Los perfiles mutacionales de la fibrosis quística (FQ) y de la distrofia muscular Duchenne (DMD) son más típicos. Existe una mutación llamada ($\Delta F508$) en el gen regulador de la conductancia transmembranal en la fibrosis quística (RTFQ) que genera aproximadamente el 70% de los alelos enfermos en poblaciones del norte de Europa. Sin embargo, se han descrito más de 300 mutaciones diferentes en el gen de la FQ que no presentan la mutación



más común. En el caso de la DMD, aproximadamente el 60% de los casos de DMD, se debe a grandes deleciones en el gen de la distrofina. Estas deleciones, a pesar de estar agrupadas en dos puntos calientes, son heteróneas, siendo muy pocos los varones afectados que comparten la misma deleción. Los casos que no presentan deleción, también son heterogéneos, existiendo un solo informe en el que dos varones aparentemente no emparentados, compartían la misma mutación puntual. Por lo tanto, aun y cuando se haya identificado el gen de la enfermedad, es posible que no se disponga de una prueba directa. En estos casos, se necesita una estrategia *genotípica indirecta*. Esta estrategia indirecta, llamada *análisis de ligamiento*, se describe más adelante, así como el estudio de un caso de aplicación clínica del análisis de ligamiento para la fibrosis quística.

Análisis indirecto

Análisis de ligamiento: polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción.

El análisis de ligamiento puede utilizarse para el seguimiento hereditario de los desórdenes de un único gen dentro de una familia. Por ejemplo, el daltonismo es un marcador fenotípico que puede ser rastreado dentro de una familia. La forma más común de la ceguera del color se manifiesta solo en los hombres; éste es un ejemplo de ligamiento genético. En este caso el gen de interés está ligado al cromosoma X.

Este tipo de análisis de ligamiento se realiza a nivel de la expresión fenotípica de un gen específico en un cromosoma específico. Resulta más difícil el monitoreo de la expresión de genes anormales a nivel molecular, especialmente cuando no se conoce el producto génico ni la secuencia específica de ADN. En el laboratorio, el cromosoma portador de la mutación se identifica por asociación a polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (PLFR). Se ha estimado que entre dos genomas humanos cualesquiera, existen diferencias en la secuencia de ADN cada 100 a 300 bases. Dado que la mayoría de estas diferencias ocurre en regiones no codificadoras, estos cambios son silenciosos y no tienen ningún efecto fenotípico en el individuo. Ocasionalmente, uno de estos cambios en una sola base, pueden alterar una pequeña región de la secuencia de ADN que define un sitio de reconocimiento para una enzima de restricción específica. En estos casos, si muestras de ADN que difieren en un sitio de restricción son tratadas con esa enzima y sujetas a una transferencia Southern, utilizando una sonda adecuada, se podrá detectar la diferencia entre ambas muestras por la diferencia en las longitudes de los fragmentos de restricción de cada una. De forma similar, si se realiza una amplificación por PCR con cebadores que flanqueen el sitio de restricción polimórfico, la digestión por la enzima de restricción, podrá cortar (sí el ADN contiene el sitio de restricción) o no (sí el sitio de restricción no está presente) el ADN amplificado. Nuevamente, la presencia o ausencia de un sitio de restricción se revela por las diferencias de tamaño de los alelos en una electroforesis en gel. Si un sitio de restricción polimórfico se encuentra cerca, en el cromosoma, del gen blanco de la enfermedad, probablemente será heredado junto con éste. Cuando éste es el caso, se dice que el gen de la enfermedad y el sitio de restricción polimórfico están ligados. Existe una tasa de error asociada con el análisis por ligamiento, que se determina por la distancia física (en pares de bases) entre el polimorfismo que afecta el sitio de restricción y el gen de la enfermedad. Si la distancia es larga, hay una alta probabilidad de que sean separados durante la meiosis debido a un evento de entrecruzamiento cromosómico. Por otro lado, si la distancia entre los dos loci es pequeña, la probabilidad de que ocurra entrecruzamiento entre ellos es muy baja. Para que sea útil



clínicamente, se debe demostrar que un PLFR particular y el locus de la enfermedad correspondiente están lo suficientemente ligados, como para que muy rara vez ocurra entrecruzamiento entre ambos. Generalmente, se requiere una tasa de entrecruzamiento $< 1\%$ (1 centimorgan) para que un PLFR particular sea considerado útil en el diagnóstico prenatal.

Análisis de ligamiento: secuencias microsatélites. Luego de demostrarse que el ADN humano contenía polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción, Botstein *et al.* (1980) sugirieron que estos polimorfismos podrían ser usados para mapear genes de enfermedades en áreas específicas de cromosomas específicos. Esta sugerencia y la identificación de PLFRs en muchos laboratorios en todo el mundo, comenzó con la era del mapeo génico y del clonado posicional. Esta era está culminando en la iniciativa del Genoma Humano. Una de las prioridades del Proyecto Genoma Humano es construir mapas genéticos y físicos del genoma humano. Los primeros polimorfismos en ser ampliamente utilizados fueron los PLFRs. Este tipo de polimorfismo fue usado en el clonado posicional de varios genes de enfermedades importantes, incluyendo los genes de la fibrosis quística y de la distrofia muscular Duchenne. Los PLFRs, aun cuando demostraron ser herramientas muy útiles para el mapeo génico, son limitados en cuanto a su contenido en información. Dado que un PLFR puede tener solamente dos alelos, la presencia o ausencia de un sitio de restricción, la máxima heterocigosidad para ese polimorfismo es del 50%; además, la mayoría de los PLFRs tienen heterocigosidades que están muy lejos de los máximos teóricos. La consecuencia de este contenido limitado de información, es que probablemente no se obtenga cierta información útil para muchas familias, a partir de un estudio de ligamiento dado.

Comenzando con las observaciones de Jeffries, los polimorfismos multialélicos se han empezado a utilizar más ampliamente. Estos polimorfismos multialélicos se deben no al cambio de una única base por otra como en los PLFRs, sino a números variables de secuencias de bases repetidas. Por lo tanto a este tipo de polimorfismo se le llama NVTR (número variable de repeticiones en tándem). Se le llama *microsatélite*, a un tipo particular de NVTR en el cual el locus que contiene la secuencia repetida es lo suficientemente pequeño como para ser amplificado por PCR. En estos casos, las repeticiones consisten en motivos de secuencia simples y muy cortos. La secuencia repetida más común, observada hasta el momento, es $(CA)_n$, aunque también se han observado repeticiones de otros dinucleótidos, trinucleótidos y tetranucleótidos, e incluso más largos. Se ha demostrado que la expansión en el número de secuencias repetidas del trinucleótido CAG en el gen del cromosoma 4p16.3 asociado a la enfermedad de Huntington, es el defecto molecular que causa la enfermedad. Cuánto mayor es el número de repeticiones, más temprano será el comienzo de la enfermedad (ver Kremer y cols. en la bibliografía). Debido a su mayor heterocigosidad y contenido de información, el uso del análisis de ADN microsatélite basado en PCR ha sustituido el uso de PLFRs para estudios de ligamiento. De hecho, cuando se comienza la búsqueda del gene de una enfermedad, un gran porcentaje de los esfuerzos de la investigación, se enfocan en la identificación de repeticiones CA cercanas al gen de interés. Además de su empleo en el mapeo génico y en la genética clínica, se ha visto que el uso de NVTRs ha demostrado ser extremadamente útil para el análisis forense de muestras biológicas (como manchas de sangre o semen) y para ensayos de paternidad.

Para utilizar el análisis de ligamiento, es necesario rastrear la herencia conjunta del marcador polimórfico y del alelo enfermo a través de toda la familia; por lo tanto, se debe



disponer del ADN de miembros clave de la familia. Un punto que es importante recordar es que las diferencias en las secuencias de ADN detectadas a través del análisis de sitios polimórficos, no generan el trastorno; simplemente permiten el seguimiento de la herencia de un gen mutante fuertemente ligado, en toda una familia.

Aplicaciones Clínicas de las Técnicas Moleculares

La tecnología de la sonda de ácido nucleico puede ser utilizada para la detección de secuencias específicas de ADN o RNA en muestras humanas. Las secuencias de ADN que resultan de interés para el profesional clínico, incluyen secuencias de genes normales, secuencias de genes anormales asociados con estados de enfermedad específicos, secuencias de genes anormales asociadas con cáncer, y secuencias de bases exógenas asociadas con organismos infecciosos, como bacterias o virus.

Cáncer

El cáncer se define como una proliferación autónoma de células con potencial metastásico. Es el desarrollo del potencial metastásico, lo que diferencia a un neoplasma de crecimiento rápido y que pone en riesgo la vida, del cáncer local de crecimiento lento y de neoplasmas benignos (sin riesgo de muerte), como los adenomas. El uso de las técnicas de biología molecular, ha permitido visualizar la exquisita interrelación entre los genes y los productos génicos que sirven para regular el ciclo celular y la proliferación celular. Cuando uno o más de estos productos génicos falla en cumplir su tarea intracelular, puede surgir un estado de crecimiento descontrolado. El mecanismo que provoca la falla (inactividad o actividad inapropiadamente elevada) de estos reguladores del crecimiento de proteína, es la existencia de una mutación en el ADN que codifica para esa proteína particular.

Aunque ciertos tipos raros de cáncer están asociados con la transmisión de genes mutantes a través de la línea germinal, la mayoría de los cánceres son el resultado de mutaciones somáticas. Entre los cientos de miles de genes del genoma humano, sólo la mutación de unos cuantos de ellos, es necesaria o suficiente para provocar descontrol del crecimiento celular. De acuerdo a nuestro entendimiento actual, existen dos grandes clases de genes con estas propiedades- los oncogenes y los genes supresores tumorales.

Oncogenes (ver también el capítulo 49).

Los oncogenes fueron el primer tipo de genes que demostraron estar involucrados en la transición de células normales bien reguladas a la masa celular de proliferación descontrolada que caracteriza al cáncer. Se define *oncogen* aquel gen que al activarse inapropiadamente provoca división celular y crecimiento tisular descontrolado. Dado que es suficiente que una sola copia del gen esté mutada para que el genotipo afecte el fenotipo (maligno contra normal), se dice que los oncogenes actúan de forma dominante. A pesar de que los primeros oncogenes descubiertos fueron de origen viral, actualmente está claro que la mayoría de los oncogenes son el resultado de mutaciones de los genes reguladores de células normales. A estos genes normales se les llama *protooncogenes*. Las actividades bioquímicas de los protooncogenes, se pueden agrupar, en general, dentro de tres categorías: (1) protein-cinasas y fosforilasas, (2) proteínas de unión a GTP (proteínas G) y proteínas de



transducción de señales, y (3) factores de transcripción. La activación inapropiada de las protein-cinasas y las fosforilasas inicia cascadas de fosforilación, que a menudo resultan en división celular. Algunos ejemplos incluyen el oncogene *erbB*, que es una forma mutante de receptor del factor de crecimiento epidérmico, y el gen *raf1*, una serín-cinasa que se cree, transmite señales, generadas en la membrana celular, a proteínas nucleares que regulan la división celular.

Las proteínas G son parte de las vías de transducción de señales. Estas vías conectan procesos de la superficie celular, como la unión de una hormona a su receptor, al núcleo. Las proteínas G se activan por la unión de guanosin trifosfato (GTP) y se inactivan por la hidrólisis de GTP a Guanosin difosfato (GDP) catalizada por GTPasas. Las proteínas G activadas interaccionan con sistemas de segundos mensajeros, como el de la adenilato ciclasa y el AMP cíclico, para estimular la transcripción de RNA en el núcleo. El ejemplo más conocido es la familia de oncongenes *ras*. Aunque las proteínas G normales tienen actividad de GTPasa que les permite finalizar la transducción de la señal, estos genes mutantes son incapaces de hidrolizar el GTP, por lo que se mantienen inapropiadamente en estado activado. Varios protooncogenes codifican para factores de transcripción, y por lo tanto modulan directamente la expresión génica. La familia de oncongenes *myc* es, probablemente, el sistema mejor estudiado. *Myc* se sobreexpresa en varios tipos diferentes de tumores y sirve para descontrolar la producción de factores de crecimiento celular.

Existen varios mecanismos para las mutaciones que provocan la activación de los protooncogenes. Los mecanismos comunes son: (1) sobreproducción del protooncogen por pérdida de la capacidad de regular ese gen, (2) concentración incrementada del protooncogen por amplificación del número de copias genómicas de ese gen, y (3) activación de un protooncogen por translocación cromosómica en la cual la región promotora de un gene regulado constitutivamente (aquel que está normalmente “encendido” durante casi todo el ciclo celular) se coloca en posición para regular un protooncogen. A pesar de que varios de estos mecanismos han sido estudiados y algunos son comunes para tipos particulares de cáncer, la alteración más común de la función o estabilidad de un protooncogen está constituida de una pequeña mutación en el ADN que codifica ese gen.

Se ha asociado la detección de formas activadas de varios oncongenes con pronósticos clínicos pobres, como la amplificación de *N-myc* en el neuroblastoma o la activación de los genes *ras* en varios tumores. Existe una necesidad imperativa de determinar la relación entre genotipo y fenotipo y la utilidad clínica de detectar oncongenes mutantes en tumores particulares.

Genes supresores tumorales.

La existencia de una clase de genes que restrinja la división celular, y que por lo tanto podría actuar como supresor tumoral fue postulada incluso antes de demostrar realmente su existencia. Luego de observar casos familiares de retinoblastoma familiar (RB) y de compararlos con casos esporádicos (no familiares) de RB unilateral, Knudson propuso que se requería de dos “impactos” o eventos mutacionales para la iniciación del crecimiento tumoral. En el caso de RB familiar, se propuso una mutación germinal en uno de los alelos supresores tumorales. En el RB familiar, había una probabilidad mucho más alta de iniciación tumoral debido a que el individuo nace con un “impacto.” Por lo tanto, las mutaciones somáticas que “impacten” o que conduzcan a la pérdida de la función normal del alelo remanente, serán



tumorigénicas. Por el contrario, el mismo evento somático en un individuo normal (uno que no sea portador de un gene RB mutante) no llevaría a la iniciación de un tumor, ya que aún se retendría un alelo funcional. La iniciación de un tumor solo ocurrirá en individuos normales si dos eventos somáticos tienen lugar en el mismo locus. Dado que no se observa la iniciación tumoral con un único alelo anormal, se dice que los genes supresores tumorales actúan como alelos recesivos.

Desde la clonación del gen de RB y de la demostración de la hipótesis de los dos “impactos”, se han identificado varios genes supresores tumorales que actúan recesivamente. Estos incluyen el gen tumoral de Wilm (TW), p53, los genes de la neurofibromatosis tipo 1 y 2 (NF1 y NF2), el gen de la poliposis cólica adenomatosa (PCA), y el gen suprimido en el cáncer de colon. Como regla, estos genes han sido identificados cuando se buscaban los genes en ubicaciones del cromosoma que están comúnmente suprimidas en ciertos cánceres.

Dado que los genes supresores tumorales están activados solo por mutaciones que destruyen la función del gen, parece razonable que las mutaciones que generan codones “de terminación” prematuros (aquellos que instruyen la traducción de los mensajes del RNA) que aparecen en el marco de lectura del gen estarían sobreexpresados. Esto ha sido observado e influenciará las opciones metodológicas en el análisis clínico para la inactivación de estos genes en muestras clínicas.

Síndromes de cáncer familiar.

La abundante evidencia epidemiológica ha demostrado que muchos cánceres tienen una mayor incidencia en los parientes de los pacientes que en la población en general. Muchos, pero no todos de estos cánceres siguen directamente patrones de herencia mendelianos (generalmente autosómicos dominantes con *penetrancia* reducida o, muy rara vez, autosómicos recesivos) (ver capítulo 47). Se cree que estos genes involucran defectos germinales en genes aislados. Por otro lado, los cánceres familiares en los que no se pueden demostrar patrones de herencia mendelianos (es decir, parientes con niveles de riesgo elevados en relación a la población general pero bastante alejados del nivel de riesgo predicho para desórdenes génicos simples), son más probablemente, el resultado de factores múltiples. Es difícil separar el riesgo aumentado en estas familias, en factores ambientales y genéticos; sin duda, ambos son importantes.

En total hay más de 50 desórdenes mendelianos reconocidos en los cuales el riesgo de cáncer es muy alto, algunas veces cerca del 100%. Un aspecto particularmente interesante de los síndromes de cáncer heredados es que a menudo ocurren múltiples tumores primarios, mientras que en un caso esporádico la presencia de más de un tumor es muy rara. Recientemente se han identificado los genes responsables de algunos de los síndromes de cáncer, incluyendo los responsables del poliposis cólica adenomatosa (cáncer de colon), neurofibromatosis tipo 1 (neurofibroma) y tipo 2 (neuroma acústico), y el síndrome de Li-Fraumani (cáncer de múltiples tejidos). No llama la atención que estos genes pertenezcan a la clase de genes supresores tumorales. A pesar de lo discutido previamente de que los genes supresores tumorales actúan de forma recesiva (el fenotipo de una célula con una o dos copias normales de un gen supresor tumoral es indistinguible, es decir, normal), el patrón de herencia es dominante con penetrancia reducida. La *penetrancia génica* reducida se refiere al hecho de que no todos los pacientes que reciben un gen mutado en el momento del nacimiento,



expresarán el fenotipo de ese gene o, en este caso, desarrollarán cáncer. La resolución de esta aparente paradoja implica darse cuenta que el rasgo heredado es el aumento de la probabilidad de desarrollar un cáncer como resultado de haber heredado un gen mutado.

Aunque el número de individuos afectados por cánceres familiares mendelianos específicos es pequeño, resulta significativo dentro del conjunto del número de tipos de cáncer, totalizando aproximadamente un 5% de los cánceres totales. La capacidad de detectar mutaciones germinales en los genes supresores tumorales será de extrema importancia en familias en las que se ha mostrado que hay transmisión de un cáncer de este tipo. Para estas familias, será crucial identificar la mutación causal en el gene relevante y luego rastrear la mutación en la genealogía de la familia. Los individuos que demuestran no presentar la mutación, no tendrán que temer sobre la posibilidad de contraer cáncer. A los individuos que demuestren ser portadores de la mutación antes de que sufran ningún síntoma, se verán beneficiados por un mayor control con el fin de identificar los tumores mientras éstos sean pequeños, pudiendo ser tratados con mayor eficacia.

Cánceres esporádicos.

La mayoría (95%) de los cánceres surgen sin que se herede ningún gene supresor tumoral mutante. Por el contrario, surgen como resultado de mutaciones en células somáticas (no germinales). En contraste con la visión lineal de la carcinogénesis, en la que ocurre primero una mutación en el gen A, seguida por una mutación en el gen B, seguida por mutación en el gen C, y así sucesivamente, la teoría actual sugiere un modelo estocástico o de red de causalidad. En esta teoría, el orden de la mutación génica no es importante; la mutación de un protooncogen o de un gene supresor tumoral puede servir como un primer “impacto”. No es necesario que el primer evento mutacional esté seguido por una mutación de un gene específico. Por el contrario, es necesaria la acumulación de mutaciones en algunos genes (el número, actualmente es desconocido) para el desarrollo de un fenotipo maligno. Además, la identidad de esos genes no está establecida. Existe una gran cantidad de genes que pueden, en teoría, actuar de forma concertada cuando están mutados para permitir que la célula se divida de forma descontrolada.

Debido a que los tumores varían ampliamente en sus características, como la de agresividad o de respuesta a una modalidad terapéutica dada, resulta razonable la búsqueda de correlaciones entre el genotipo del tumor (el conjunto de genes que están mutados y el tipo de mutaciones que presenta) y el fenotipo del tumor (el comportamiento observado del tumor). A pesar de que la capacidad de realizar correlaciones genotipo/fenotipo está en sus comienzos, la identificación de mutaciones asociadas al cáncer y su correlación con el fenotipo clínico brindará un importante conocimiento sobre las características funcionales tanto de las proteínas oncogénicas como de las supresoras tumorales. Finalmente, estas relaciones de estructura/función contribuirán al entendimiento de la participación de estas proteínas en el crecimiento y desarrollo celular y ayudarán al desarrollo de estrategias terapéuticas para modificar y evitar el funcionamiento anormal.

Entre los primeros genes para los que han empezado a emerger las correlaciones genotipo/fenotipo está el p53. Esta proteína tiene múltiples roles en la célula normal. Está asociada tanto con la activación transcripcional de factores de crecimiento celular como con la regulación negativa de los genes supresores del crecimiento. Además, se ha determinado recientemente que p53 participa en la regulación de la vía apoptótica (muerte celular programada) que es activada en respuesta a severos daños celulares. Originalmente se



clasificó a p53 como un oncogen. La primera mutación descubierta en p53 cumplía el primer criterio estándar para un oncogen; es decir, su efecto se manifestó de forma dominante. Se demostró que la mayoría de las mutaciones de sentido equivocado de p53 tenían esencialmente el mismo efecto en la proteína p53, esto es incrementar su vida media. Las mutaciones de sentido equivocado se deben al reemplazo del aminoácido normal por otro incorrecto, mientras que las mutaciones sin sentido se deben a la delección de un aminoácido en la cadena peptídica. Por lo tanto, el p53 mutante resistente a la degradación, continúa estimulando el crecimiento celular aun cuando el crecimiento sea una respuesta inapropiada a estímulos externos o internos. Sin embargo, inmediatamente se demostró que muchas (aproximadamente la mitad) de los genes p53 mutantes caracterizados, eran mutaciones sin sentido incapaces de producir la proteína p53. Más adelante se demostró que muchos tumores tenían mutaciones sin sentido en los dos alelos de p53. Por lo tanto, el gen podría funcionar no solo como un oncogen sino también como un gen supresor tumoral.

La identidad de mutaciones específicas de p53 tiene implicaciones en terapia. En el caso de la p53 de larga vida, la vía apoptósica aún es viable; por lo tanto, resultan efectivas las maniobras terapéuticas como la terapia por radiación realizada con el fin de causar suficiente daño celular para que las células experimenten muerte programada. Por otro lado, en completa ausencia de p53, no se puede desencadenar la vía apoptósica, lo que resulta en un fenotipo resistente a la radiación. Recientemente, se ha demostrado que p53 juega un papel central en la angiogénesis (producción de la red vascular sanguínea) de los tumores metastásicos. El conocimiento de las mutaciones de p53 será crítico para la adecuada aplicación de las nuevas terapias en estos casos.

Enfermedades infecciosas

La revolución del diagnóstico por ADN, no ha tenido efectos tan profundos en ningún otro caso más que en la detección de agentes infecciosos. Es probable que en pocos años, las técnicas basadas en PCR reemplazarán incluso los cultivos de rutina, para la detección de patógenos bacterianos como *Escherichia coli*. Las consideraciones económicas apuntan el camino hacia el análisis de resistencia a drogas basado en PCR. De igual importancia es la capacidad de las técnicas moleculares de identificar la presencia de organismos infecciosos *in situ*, es decir, directamente en el proceso patológico. Esto se puede alcanzar a través de la extracción de ácidos nucleicos directamente a partir de delgadas secciones de tejidos obtenidos de biopsias, o por técnicas de hibridación *in situ* o amplificación.

Actualmente el uso clínico de los métodos moleculares se aplica solo en la detección de organismos que son difíciles o imposibles de cultivar, como especies de *Mycobacterium*, hongos y virus. En estos casos las ventajas económicas superan a los enfoques clásicos. Además, el diagnóstico molecular provee mejor información en términos de sensibilidad y especificidad. Aún más determinante, a partir del diagnóstico molecular se pueden obtener resultados en el mismo día, o de una día para otro para el mismo diagnóstico que antes llevaba semanas.

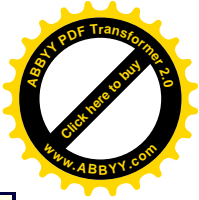
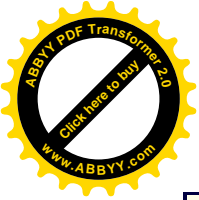
La detección de agentes infecciosos por métodos moleculares presenta problemas diferentes a los del análisis de secuencias de ADN celular endógeno. Las secuencias de ácido nucleico de los agentes infecciosos tienden a ser novedosas y presentan señales claras, de modo que se pueden usar los métodos de detección basados en hibridación por sondas o en la amplificación de la secuencia blanco. Sin embargo, las muestras que se necesitan para los



análisis pueden resultar más difíciles de obtener que por medio de una simple punción venosa. Por ejemplo, el método de amplificación de cadena ramificada para el diagnóstico de las especies de *Mycobacterium* (Chiron, Alameda, California) debe lidiar con materiales no uniformes como el esputo, que contiene patógenos cubiertos de cera en agrupaciones irregulares. Otras muestras útiles pueden ser heces, orina o tejido. La probabilidad de un error en el muestreo es grande, y el protocolo de preparación de la muestra es crucial. Aún, a pesar de que las secuencias de los agentes infecciosos son novedosas con respecto al ADN humano, la contaminación puede ser un problema importante cuando se detectan organismos que sobreviven en el medio ambiente. Por ejemplo, más del 50% del polvo de la casa está compuesto por piel humana descamada. Los ensayos para dermatofitos no cultivables como el virus de papiloma humano (VPH) son altamente susceptibles a la contaminación por dichas fuentes.

A pesar de que existe una preocupación única por el uso de métodos moleculares en la detección de agentes infecciosos, algunas de las primeras pruebas clínicas que usaron la tecnología del ADN fueron desarrolladas en esta área. En la Tabla 48-1 se muestra una lista de los agentes infecciosos y distribuidores de materiales de los estuches de prueba. Dado que la consideración primaria para una prueba microbiológica es su sensibilidad, y que las secuencias novedosas de los organismos permiten generalmente una amplificación por PCR muy limpia, se han desarrollado varios métodos para intensificar aun más la transmisión de la señal. Estos métodos generalmente emplean la inmovilización de productos de PCR o ADN viral, por anticuerpos o moléculas de captura de avidina, seguido por la generación de señal por un complejo apropiado entre una molécula de captura secundaria y una enzima. Algunos ejemplos de este tipo de ensayos son el ensayo de hibridación sandwich para productos de PCR, Digene Diagnostics, Silver Springs, Maryland) y el ensayo de hibridación intensificada en microplaca, ENZO Diagnostics, Syosset, New York). La señal del ensayo puede ser colorimétrica o luminiscente, empleando instrumentos comunes en la química clínica. Otro análisis prometedor es la medida directa de productos de PCR por luminiscencia electroquímica (LEQ), que puede ser detectada manualmente o con instrumentos específicos, como el PCR 5000 (Perkin Elmer, Foster City, California).

Existen muchos otros métodos además de la PCR que son importantes en el diagnóstico de enfermedades infecciosas. Muy a menudo, lo que importa no es la presencia de un organismo pero sí las actividades presentes en el proceso infeccioso. Por ejemplo, los virus VPH y el herpes están difundidos. La obtención de resultados positivos para VPH en el tracto genital o del virus de Epstein Barr en la población linfocitaria de un paciente dado, es ciertamente de valor muy limitado. Sin embargo, la información referente a la actividad transcripcional de estos agentes puede ser importante para el tratamiento del paciente. Una técnica de importancia, utilizada para la obtención de este tipo de información es la hibridación *in situ*. En este método, una sección fina de tejido de muestras frescas o fijadas puede ser analizada con una sonda para encontrar secuencias de RNA y ADN virales. Esta información es un complemento muy poderoso a la citología clásica. Recientemente, se ha descrito la técnica de PCR *in situ*, y los fabricantes de instrumentación para PCR han comenzado a desarrollar instrumentos para este propósito. Es importante recordar que el problema más grande del uso de estos métodos en materiales fijados y embebidos es la calidad del proceso de fijación. Se prefieren solución salina amortiguada adicionada con formalina, dado que muchos otros fijadores tienen efectos perjudiciales en el ADN y RNA en las secciones de tejidos.



Desórdenes genéticos

Las variantes anormales de las secuencias normales de ADN se asocian con enfermedades de origen genético (ver capítulo 47). Se pueden utilizar las técnicas moleculares para el diagnóstico prenatal de estas enfermedades, dando a los respectivos padres la oportunidad de buscar consejo genético. En el cuadro de adelante se enumeran los desórdenes genéticos para los cuales se dispone actualmente de análisis por sondas de ADN. En la medida en que avance el Proyecto Genoma Humano, esta lista debería expandirse rápidamente.

En general, los desórdenes genéticos pueden agruparse en las siguientes categorías: anomalías cromosómicas, desórdenes multifactoriales, y desórdenes de un único gen. La discusión en este capítulo está centrada en desórdenes de un solo gen.

Los desórdenes de un solo gen, se heredan de acuerdo a alguno de los siguientes patrones: autosómico dominante, autosómico recesivo o ligado al X. Los términos *autosómico* y *ligado al X*, se refieren a la ubicación cromosómica del gen causante de la enfermedad o mutante. Generalmente, en desórdenes ligados al X, los hombres con el gen mutante expresan el desorden, mientras que las mujeres con el mismo gen son *portadoras* y generalmente, no padecen la enfermedad. Algunos ejemplos de desórdenes ligados al X son la distrofia muscular Duchenne y la hemofilia. Los desórdenes *dominantes* se expresan en individuos homocigotos o heterocigotos; los desórdenes *recesivos* se expresan solo en individuos homocigotos para el gen mutante, que llevan dos copias del gen defectuoso. La acondroplasia y la enfermedad de Huntington son ejemplos de desórdenes autosómicos dominantes. Por otro lado, la fibrosis quística, la anemia falciforme y la fenilcetonuria son ejemplos de desórdenes autosómicos recesivos. Los individuos que sean heterocigotos para estos desórdenes recesivos serán portadores.

Aplicaciones Clínicas Comunes de Análisis de Ligamiento de ADN
Fibrosis quística Distrofia muscular Duchenne Hemofilia A y B Deficiencia alfa ₁ -antitripsina Anemia falciforme Talasemia Fenilcetonuria Enfermedad poliquística de riñón adulto Enfermedad de Huntington

Diagnóstico prenatal.

Las sondas de ácido nucleico y los análisis de ligamiento han sido usados con éxito para el diagnóstico prenatal o presintomático de desórdenes genéticos. Para realizar una prueba prenatal, se debe obtener ADN del feto, ya sea por *amniocentesis*, en la cual las células fetales son obtenidas por extracción del fluido amniótico (ver capítulo 40), o por muestreo de vellosidad coriónica, en donde se obtienen células fetales de las vellosidades de la membrana coriónica cuando el feto tiene aproximadamente 9 semanas de edad.

El uso de análisis de ligamiento para la detección de desórdenes genéticos comienza

cuando una familia busca a un consejero genético. El consejero genético explica a la familia los procedimientos y limitaciones (esto es, la amniocentesis contra el muestreo de vellosidades coriónicas), obtiene un *árbol genealógico* (historia familiar detallada), completa los formularios de consentimiento adecuados, y contesta todas las preguntas que la familia pueda formular. Se obtienen muestras de sangre periférica del miembro de la familia afectado por el desorden (probando), de los padres naturales, y de cualquier miembro de la familia interesado. Si se requiere un diagnóstico prenatal, se extrae una muestra fetal de vellosidades de la membrana coriónica (entre las 9 a 11 semanas de gestación) o por amniocentesis (15 a 17 semanas). Se realizan ya sea la detección directa de la mutación o el análisis del ligamiento con los PLFRs adecuados. Si los resultados llegan a determinar con claridad el estado genético de toda los miembros de la familia, se informa y aconseja apropiadamente a la familia. Si el estado no puede ser determinado inequívocamente, entonces se repite el proceso previo con sondas y enzimas de restricción adicionales. Como resultado, todo el proceso puede llevar entre 2 y 3 semanas. A su vez, las muestras de ADN para el diagnóstico prenatal obtenidas de vellosidades de la membrana coriónica y por amniocentesis, a menudo necesitan el cultivo celular para producir cantidades adecuadas de ADN, lo que alarga aún más el tiempo total requerido. Idealmente, el diagnóstico prenatal debería ser la continuación de los estudios familiares de preconcepción en los que se hayan determinado las sondas de ADN adecuadas y las endonucleasas de restricción a ser usadas en la muestra fetal.

Factores que afectan las pruebas génicas para desórdenes genéticos.

A continuación se discutirán los factores que pueden disminuir la exactitud de la prueba:

1. La recombinación (entrecruzamientos) que ocurre entre la secuencia de ADN reconocida por la sonda y el gen de interés. Este problema puede minimizarse utilizando sondas fuertemente ligadas (muy cercanas) al gene de interés.
2. La identificación incorrecta de las relaciones paternas puede causar una mala interpretación de los resultados, ya que el procedimiento se basa en la comparación de los patrones de herencia de una generación a otra generación.
3. El diagnóstico erróneo del sondeo puede invalidar los resultados, dado que las bases del análisis de ligamiento dependen de la comparación de los patrones en los fragmentos de restricción del individuo afectado con aquellos con una enfermedad específica.
4. La heterogeneidad genética o los desórdenes pueden ser el resultado de más de un defecto génico, algunas veces en cromosomas diferentes.
5. Los errores de laboratorio pueden incluir muestras mal rotuladas, contaminación de la sonda, digestión incompleta del ADN por la endonucleasa de restricción, o mala interpretación del autorradiograma.

Además, no todas las familias pueden verse beneficiadas al aplicar el análisis de ligamiento a su desorden genético, por las siguientes razones:

1. El análisis de ligamiento es una prueba indirecta que requiere la comparación de los patrones de los fragmentos de restricción de ADN del individuo afectado con el de otros miembros de la familia. La prueba no puede realizarse sin una muestra de ADN del individuo afectado y de sus padres naturales. Por esta razón, la prueba no puede utilizarse para monitorear la población en general.
2. El ADN de algunas familias puede no generar patrones de PLFR informativos, utilizando



las combinaciones entre las sondas y enzimas de restricción existentes.

Caso Ilustrativo: Fibrosis Quística

Antecedentes clínicos (ver también capítulos 29 y 47)

Tanto el análisis mutacional directo como el análisis de ligamiento son utilizados para el diagnóstico prenatal y la detección del estado portador de la fibrosis quística (FQ). La FQ se hereda como un desorden autosómico recesivo y es causado por mutaciones en el gen CFTR del cromosoma 7. La FQ se caracteriza por secreciones espesas que obstruyen las glándulas exocrinas y que producen enfermedades pulmonares crónicas, insuficiencia pancreática, y electrolitos anormales en el sudor. La FQ se diagnostica a partir de manifestaciones clínicas, una historia familiar positiva para la enfermedad, y una elevada concentración de cloruro en el sudor (ver pág. 566). Otras pruebas de laboratorio que pueden ser útiles para documentar la insuficiencia pancreática incluyen la prueba del *ácido p-aminobenzoico* (APAB) y la prueba de estimulación pancreática (ver pág. 562). Algunos programas piloto monitorean la FQ en niños recién nacidos basándose en una elevada actividad de tripsina inmunorreactiva (TIR) en gotas de sangre obtenidas inmediatamente después del nacimiento. Se observa una actividad disminuida de enzimas de las microvellosidades (la isoenzima intestinal de la fosfatasa alcalina, fosfatasa alcalina leucocitarias, y gama-glutamyltransferasas) en el líquido amniótico de fetos con FQ, lo que puede usarse como base para el diagnóstico prenatal cuando no se dispone o no son útiles los ensayos con ADN.

Opciones de pruebas genéticas

En 1989, se identificó el gen que codifica para la proteína defectuosa en la FQ, que es el *regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística*, o RCFQ, por medio de una nueva estrategia para el clonado de genes implicados en enfermedades, llamado *clonación posicional*. Este enfoque no depende de técnicas bioquímicas clásicas, sino de encontrar polimorfismos fuertemente ligados. Previo a la identificación del gen en sí mismo, se identificaron varios PLFRs que resultaron útiles clínicamente para determinar el estado portador de los miembros de la familia y en el diagnóstico prenatal. Se esperaba que la identificación del gen permitiría el reemplazo en el laboratorio, de todos los procedimientos indirectos de ADN por pruebas directas. Sin embargo, esto no ha sido posible en todos los casos. La razón de que se continúe confiando en las pruebas indirectas es la heterogeneidad genética. A pesar de que se ha observado una mutación aislada en la cual una delección de tres bases resulta en la delección de un solo residuo fenilalanina en la posición 508 de la proteína RCFQ madura, en el 70% de los cromosomas FQ en todo el mundo, las mutaciones remanentes son extremadamente heterogéneas. Hasta el momento, se han identificado más de 400 mutaciones diferentes causantes de la FQ. Además de la mutación $\Delta F508$, hay varias otras mutaciones que están presentes en más del 0.1% de los cromosomas FQ. Por lo tanto, las estrategias de identificación actual de portadores en una familia y de diagnóstico prenatal consisten en la realización de 6 a 30 ensayos diferentes para mutaciones específicas, de preferencia en el individuo de interés, seguido por análisis de ligamiento usando polimorfismos fuertemente ligados e intragénicos, si es necesario. Este ensayo combinado es informativo en



prácticamente todas las familias.

Reporte de un caso

El Sr. y la Sra. K, tienen una hija, una niña de 3 años de edad con FQ. A la niña se le diagnosticó FQ a los 18 meses de edad, basándose en infecciones pulmonares recurrentes y en la presencia en el sudor de concentraciones de cloruro de 100 a 105mEq/L. Cuando la Sra. K estaba nuevamente embarazada de 16 semanas, la familia K consultó al doctor sobre el diagnóstico prenatal. El doctor los refirió a un consejero genético para obtener más información. Luego de la consulta genética, se extrajo sangre del Sr. y la Sra. K, así como de la hija afectada, y se realizó una amniocentesis para obtener una muestra de ADN fetal. Primero se analizó el ADN del individuo sonda usando un panel de 12 mutaciones, que identifican aproximadamente el 85% de los alelos de la FQ en la población de Norte América. El genotipo de la niña afectada fue $\Delta F508$ /Unk (mutación desconocida). Luego se ensayó el ADN fetal, encontrándose que tenía una copia de la mutación $\Delta F508$. Se les ofreció a los padres la opción de probar con una batería de 50 pruebas mutacionales con la esperanza de identificar la mutación desconocida, o seguir con el análisis de ligamiento. Los padres tuvieron otra reunión con el consultor genético, quien les informó que el panel mutacional extra identifica entre 1% y 2% más de los alelos de la FQ, así como del mecanismo potencial de error en los análisis de ligamiento. Luego de considerarlo, esta familia eligió proceder con el análisis de ligamiento. Se analizaron PLFRs en dos loci extragénicos pero fuertemente ligados (XV.2c y KM-19) y en tres loci intragénicos (M470V, GATT, y TUB-18) mediante el uso de métodos basados en PCR. En la Fig. 48-4 se muestra el árbol genealógico de la familia y los resultados. El feto recibió el cromosoma con la FQ del padre; ese cromosoma lleva la mutación $\Delta F508$ y el haplotipo (o series de polimorfismos) que resultan en 1,2,M,7,2. Esto indica que el feto es por lo menos portador de la FQ. Sin embargo, la niña afectada recibió el haplotipo 2,1,M,7,2 de la madre, lo que está indicando que la mutación desconocida de la FQ de la madre es heredada conjuntamente con el haplotipo 2,2,M,8,1. Por lo tanto, la combinación del análisis directo y de ligamiento en esta familia, indica que el feto es portador pero no está afectado por la FQ. Debido al ligamiento tan fuerte, y a los dos loci informativos dentro del mismo gen (notar que el locus M480V no es informativo para esta familia), el riesgo de error estimado por recombinación es extremadamente pequeño. Al Sr. y la Sra. K se les informó de los resultados por medio del consejero genético y decidieron continuar con el embarazo, planeando utilizar para el bebé la prueba del sudor, unos pocos meses después del nacimiento. Cuando el niño tenía 3 meses de edad, se realizó la prueba del sudor con resultados normales.

Bibliografía

General

- Dracopoli NC, Haines JL, Kork BR, et al, editors: *Current protocols in human genetics*, New York, 1994, Wiley & Sons.
- Farkas D, editor: *Molecular biology and pathology: a guidebook for quality control*, New York, 1993, Academic Press.
- Silverman LM, Hine R, editors: *Molecular pathology*, Durham, N.C., 1994, Carolina Academic Press.

Genética del cáncer



Cho Y, Gorina S, Jeffrey PD, Pavletich NP: Crystal structure of a p53 tumor suppressor\NDNA complex: understanding tumorigenic mutations, *Science* 265:346-355, 1994.

Dean M, Vande Woude GF: Introduction to methods in molecular biology. In DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, editors: *Cancer: principles and practice of oncology*, ed 3, Philadelphia, 1989, Lippincott.

Friend S: p53: a glimpse at the puppet behind the shadow play, *Science* 265:334-335, 1994.

Hodgson SV, Maher ER: *A practical guide to human cancer genetics*, New York, 1993, Cambridge University Press.

Knudson AG: Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma, *Proc Nat Acad Sci USA* 68:820-824, 1971.

Levine AJ: The tumor suppressor genes, *Annu Rev Biochem* 62:623-51, 1993.

Lemoine NR, Wright NA, editors: *The molecular pathology of cancer*, Plainview, N.Y., 1993, Cold Spring Harbor Press.

Special Cancer Issue, *Science* 254:1131-1177, 1991.

Enfermedades infecciosas

Greer CE, Peterson HT, Kiviat NB, Manos MM: PCR amplification from paraffin embedded tissues, *Am J Clin Pathol* 95:117, 1991.

Naber SP: Molecular pathology: diagnosis of infectious disease, *N Engl J Med* 331:1212-1215, 1994.

Nuovo JN, Gallery F, MacConnell P, et al: An improved technique for the *in situ* detection of DNA after polymerase chain reaction amplification, *Am J Pathol* 139:1239, 1991.

Rersing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ, editors: *Diagnostic molecular microbiology: principles and applications*, Washington, D.C., 1993, American Society for Microbiology.

Terry G, Ho L, Szarewski A, Cuzick J: Semi-automated detection of human papillomavirus DNA of high and low oncogenic potential in cervical smears, *Clin Chem* 40:1890-1892, 1994.

Tsongalis GJ, McPhail AH, Daniel R, et al: Localized in situ amplification (LISA): a novel approach to in situ PCR, *Clin Chem* 40:381-384, 1994.

Genética

Botstein D, White R, Scolnick M, Davis R: Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms, *Am J Hum Genet* 32:314, 1980.

Buffone GJ, Spence JE, Fernbach SD, et al: Prenatal diagnosis of cystic fibrosis: microvillar enzymes and DNA analysis compared, *Clin Chem* 34(5):933, 1988.

Kerem B-S, Rommens JR, Buchanan JA, et al: Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis, *Science* 245:1073-1087, 1989.

Kremer B, Goldberg P, Andrew SE, et al: A worldwide study of the Huntington's disease mutation: the sensitivity and specificity of measuring CAG repeats, *N Engl J Med* 330:1401-1406, 1994.

LeGrys V, Leinbach SS, Silverman L: Clinical applications of DNA probes in the diagnosis of genetic diseases, *CRC Crit Rev Clin Lab Sci* 25:255, 1987.

Pearson PL: Restriction fragment length polymorphisms and their use in mapping the human genome. In Kare B, editor: *Progress in clinical biology research*, New York, 1985, Alan R Liss.

Pena SDJ, Chakraborty R, Epplen JT, Jeffreys AJ, editors: *DNA fingerprinting: the state of the science*, Boston, 1993, Birkhäuser Verlag.

Tablas

Tabla 48-1. Algunas sondas representativas de ácido nucleico disponibles para el diagnóstico

2003

de enfermedades infecciosas (no es una lista exhaustiva de todos los agentes o distribuidores).

Agente infeccioso	Distribuidor
Chlamydia trachomatis	Gen Probe (San Diego, Calif.)
Salmonella	Gen Probe (San Diego, Calif.)
Virus de Inmunodeficiencia humana	Gen Probe (San Diego, Calif.)
Papilomavirus humano	Digene (Silver Springs, Md.)
Virus Hepatitis B	Enzo Diagnostics (Syosset, N.Y)
Mycobacterium sp.	Chiron (Alameda, Calif.)

Figuras

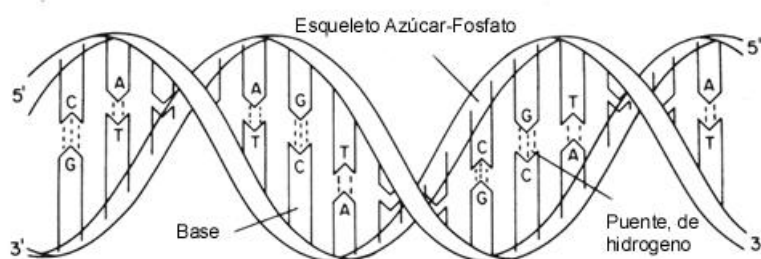


Figura 48-1 Estructura del ADN. La molécula de ADN es una doble hélice que consiste en dos esqueletos azúcar-fosfato con cuatro bases: citosina (C), guanina (G), adenina (A), y timina (T) adheridas. Los residuos C y G, y A y T en hebras opuestas se aparean a través de puentes de hidrógeno. (De: LeGrys V, Leinbach SS, Silverman L: *CRC Crit Rev Clin Lab Sci* 25:255, 1987).

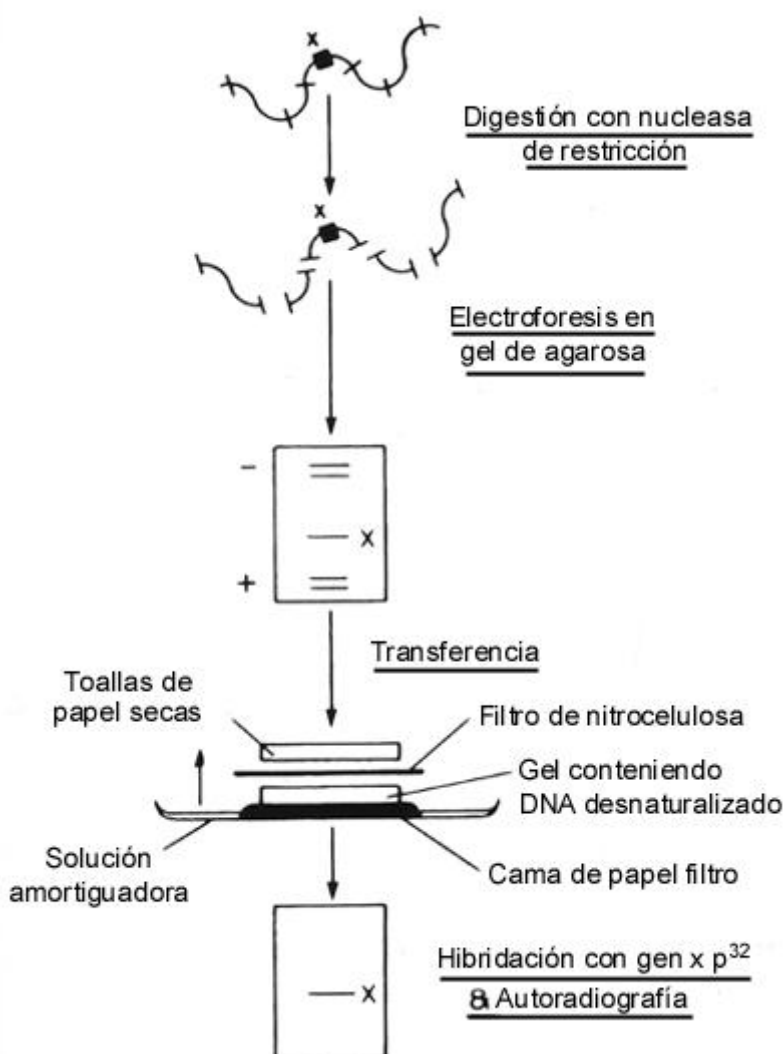


Figura 48-2 Identificación por hibridación usando transferencia Southern de fragmentos de ADN que contienen el gen X. El ADN fue digerido con endonucleasas de restricción, y los fragmentos resultantes fueron fraccionados de acuerdo al tamaño por electroforesis en gel de agarosa. Los fragmentos de ADN en el gel fueron desnaturalizados y transferidos a un filtro de nitrocelulosa como resultado de un flujo de amortiguador a través del gel y el filtro de nitrocelulosa a toallas de papel seco. Luego se hibrida el ADN en el papel de filtro con una sonda del gen X marcada con ^{32}P , y la autorradiografía reveló fragmentos simples de ADN conteniendo el gene X. (De: LeGrys V, Leinbach SS, Silverman L: *CRC Crit Rev Clin Lab Sci* 25:255, 1987).

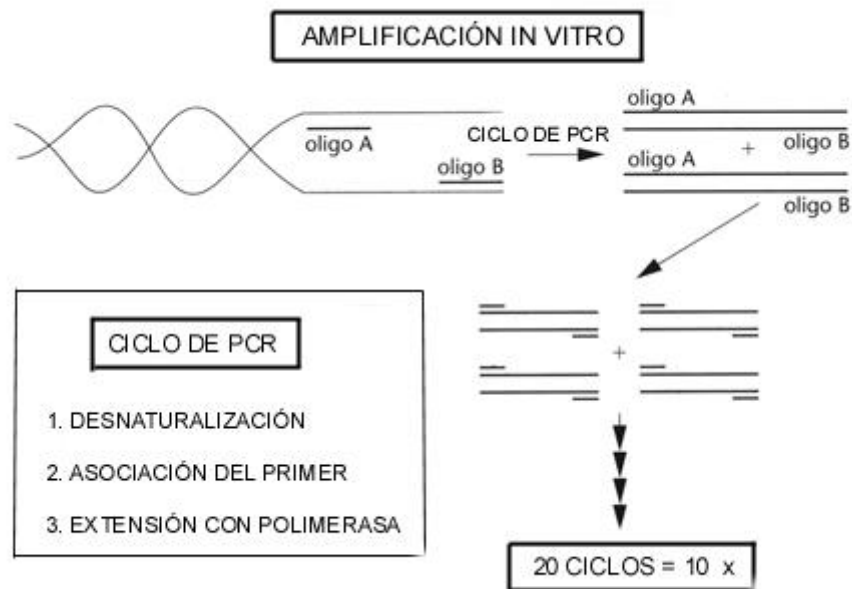


Figura 48-3 Esquema del primer ciclo de una reacción de PCR (De: Highsmith WE, Silverman LM: *Lab Med Bull* 104: 1-4, 1989).



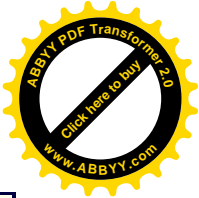


Figura 48-4 Árbol genealógico de la familia K con los resultados de un panel de ensayos directos e indirectos.

CAPÍTULO 49

49. Neoplasia

Bernard E. Statland

Per Winkel

Incidencia del cáncer en los Estados Unidos

Cáncer: naturaleza de la enfermedad

Etiología

Diversidad de las células cancerosas

Tiempo como un factor

Revisión de la función de las pruebas de laboratorio

Detección (tamizaje)

Confirmación

Clasificación y reconocimiento del estadio

Monitoreo

Definición del marcador tumoral ideal

Ética del proceso de pruebas

Cambio del compuesto analizado en la enfermedad

Clases de agentes bioquímicos usados como marcadores tumorales

Antígenos oncofetales

Enzimas

Otras enzimas

Productos de degradación del colágeno

Marcadores celulares

Análisis de receptores esteroideos

Factores relacionados a la hemostasis

Conclusiones

Métodos de análisis

Fosfatasa ácida

Beta2-Microglobulina

Antígenos carcinoembrionarios (ACE)

Inmunoelectroforesis

Cuantificación de inmunoglobulina

Antígeno específico de próstata

Electroforesis de proteínas del suero

OBJETIVOS

2007



- Describir brevemente los factores biológicos que pueden resultar en cáncer.
- Enumerar la función de las pruebas de laboratorio en la evaluación de cánceres.
- Definir y describir un marcador tumoral ideal
- Enumerar los marcadores químicos y celulares comúnmente usados y establecer su significado clínico en relación a los cánceres.

Términos clave

antígenos carcinoembrionarios Una glucoproteína producida por o asociada con células cancerosas, la cual también es expresada por células fetales. En individuos saludables son detectados niveles pequeños. La detección es por análisis inmunoquímico.

carcinógeno Un agente, generalmente químico, que transforma una célula de un estado normal a uno canceroso.

cocarcinógeno Un agente que por sí solo no transforma una célula normal en un estado canceroso pero en conjunto con otro agente puede afectar la transformación.

confirmación Uso de una segunda prueba con una especificidad muy alta para verificar la observación de una prueba menos específica (como el caso de una biopsia para verificar una masa con apariencia de tumor).

desdiferenciación Proceso mediante el cual las células pasan de lo más específico a lo más general en la naturaleza. Generalmente tales células pierden su arquitectura morfológica y la habilidad de sintetizar componentes específicos (como los receptores de estrógenos).

diseminación La fase del cáncer en la cual las células se propagan a varias partes del cuerpo distantes del sitio de origen.

fase inductora El período durante el cual una célula normal comienza a transformarse en una célula cancerosa..

frotis de Pap (Papanicolaou) Prueba común de tamizaje para el cáncer, en el cual las células del cuello uterino son examinadas para evaluar anormalidades citológicas relacionadas con el cáncer.

heterogeneidad Variación en la expresión de genes entre las células cancerosas. Existen diferencias entre células, y no todas las células dentro de un tumor son positivas para un mismo antígeno o responden a la misma droga.

invasión El proceso por el cual las células malignas se mueven a tejidos más profundos y atraviesan la membrana basal, ganando acceso a las vesículas sanguíneas y a los canales linfáticos.

in situ Un término usado para mostrar que las células cancerosas están localizadas en su lugar de origen

marcador tumoral Un término mal usado que se aplica a moléculas que pueden ser usadas para diagnosticar o monitorear la presencia o crecimiento de un cáncer. Generalmente tales marcadores no son específicos para el cáncer.

metástasis Células cancerosas que se han propagado a otros órganos y han formado colonias que están creciendo y a menudo invaden el órgano.

monitoreo Medición de un marcador bioquímico de cáncer después de confirmado el diagnóstico (tal como el uso del antígeno carcinoembrionario para vigilar el cáncer colorrectal) para evaluar la presencia o crecimiento del cáncer.

neoplasia “Crecimiento nuevo”, el crecimiento sin restricción de células que resultan en



cáncer.

oncogen Un gen cuyo producto proteico puede causar el desarrollo de un cáncer cuando la proteína está presente (o ausente) en cantidades normales.

posicionamiento Proceso de diagnóstico en el cual el patólogo determina la ubicación del cáncer en el ciclo progresivo de fases: inducción, in situ, invasión, y diseminación.

proteína oncofetal Una proteína, generada por el feto, producida por o asociada con células cancerosas; sin embargo, esta proteína es generalmente producida en el niño o en el adulto en muy bajos niveles.

receptor de estriol El receptor de membrana específico de tejido, en mama se une a la hormona estriol. Su presencia en el cáncer de mama significa un tumor diferenciado.

transformación En oncología, el proceso por el cual una célula normal se transforma en maligna, es decir, en cancerosa.

Incidencia de Cáncer en los Estados Unidos

Los cambios en la longevidad, la introducción de carcinógenos en el medio ambiente, y otros factores han modificado la incidencia del cáncer en los Estados Unidos. La Tabla 49-1 presenta los porcentajes de muertes por cáncer por órgano y sexo tabulados en 1987 en los Estados Unidos. Los sitios mas fuertemente asociados con muertes por cáncer en hombres de todas las edades son, en orden decreciente, pulmón, área colorrectal, próstata, páncreas y estómago. Se cree que los carcinógenos del tabaco son responsables de las alteraciones en el material genético celular (ácido desoxirribonucleico, DNA) que conducen al desarrollo de cáncer de pulmón, mientras que los carcinógenos de la dieta causan lesiones similares en el DNA que resultan en el cáncer colorrectal. En las mujeres, de todas las edades los sitios de cánceres más comunes son mama, área colorrectal, pulmón, útero y ovario. La incidencia del tabaquismo en hombres y mujeres está directamente relacionada con la incidencia del cáncer de pulmón. La distribución de mortalidad por órgano está influenciada por factores geográficos. Por ejemplo, en Japón, a diferencia de los Estados Unidos, los cánceres de esófago y estómago son los tipos más comunes de neoplasias malignas. En los países occidentales el cáncer es la segunda causa de muerte. Aproximadamente una de cada cinco personas en los Estados Unidos morirán por cáncer.

Cáncer: Naturaleza de la Enfermedad

La teoría clonal de los estados de la carcinogénesis establece que los cánceres derivan de una célula original transformada. Esta célula transformada, o clona, es una célula normal cuyo material genético ha sido alterado por lo que dicha célula y su progenitora pierden aquellas funciones reguladoras que gobiernan la replicación y muerte celular. A través de un proceso evolutivo que comprende varios pasos, las células que derivaron de la célula modificada inicialmente, comienzan a multiplicarse, fuera del control de los sistemas inhibidores locales normales, invadiendo a menudo otras partes del cuerpo. Esta última fase, denominada *metástasis*, es generalmente la causa de muerte por cáncer.

Diversos puntos de evidencia han llevado a los científicos a creer que más de un gen



debe alterarse antes de que una célula maligna sea formada. Primero, existe una relación entre cáncer y edad; es decir, a medida que el individuo envejece la probabilidad de cáncer aumenta. Se requiere de tiempo para permitir la acumulación de daño genético, el cual puede dar lugar al estado transformado (ver adelante). Segundo, las células cancerosas pueden exhibir múltiples lesiones genéticas. Tercero, es más probable que ocurra el cáncer en células proliferantes. De este modo el cáncer de corazón es muy raro, pero los cánceres de las células blancas sanguíneas son muy comunes. Debido a que los glóbulos blancos proliferan, hay enorme potencial para la expresión de las lesiones genéticas y para que los procesos de división celular se tornen descontrolados.

Etiología

Sager^{ref(1906)} ha descrito la causa del cáncer como un proceso genético de estadios múltiples. Las etapas incluyen

1. Daño inicial del DNA
2. Ruptura y rearreglo cromosómico; replicación genética
3. Selección de células mutantes que crecen exitosamente

Los cambios iniciales en el DNA celular pueden ser causados por una variedad de carcinógenos, incluyendo radiación, sustancias químicas, virus, y agentes no conocidos. Esto lleva a un control defectuoso del crecimiento y a una pérdida de la estabilidad cromosómica. La ruptura y rearreglo cromosómico ocurren en varias fases continuas después de la iniciación de la división celular. Esto se manifiesta más tarde en términos de transposiciones cromosómicas aberrantes, las cuales llevan a rearreglos genómicos (ver capítulo 47).

Los cambios en el DNA y en los cromosomas dan lugar a un nuevo patrón de la expresión genética, creando un nuevo fenotipo, en el cual genes previamente inactivos ahora son expresados, genes previamente expresados ahora están inactivos, o hay un exceso en la expresión de ciertos genes clave. Actualmente se cree que los primeros cambios en la expresión de los genes que pueden llevar a que una célula se transforme ocurren en genes que normalmente regulan el crecimiento y la muerte celular.^{ref(1907)} Estos genes reguladores recientemente expresados o sobreexpresados son conocidos como oncogenes.^{ref(1908)} Una lista por clase de los productos de oncogenes derivados de las células se presenta en la Tabla 49-2. Los ensayos que detectan oncogenes en tejidos cancerosos humanos se están volviendo disponibles rápidamente (ver capítulo 47). Estos ensayos pueden usarse potencialmente para la predicción del desarrollo de cánceres asociados a oncogenes en grupos de alto riesgo.^{ref(1909)}

Una célula que ha sido transformada tiene solamente el potencial para desarrollarse en un cáncer. La expresión del fenotipo del cáncer requiere de la división celular, la cual puede ser inducida por daños genéticos adicionales o puede ser el resultado de una inducción natural de la división celular. Esto puede ser visto en la relación inversa entre el desarrollo de un cáncer de mama y la edad a la cual una mujer experimenta un embarazo. Esta relación es probable el resultado de una sola inducción de las células hiperplásicas del epitelio mamario que ocurre en un primer embarazo. Cuánto más tarde en la vida ocurra el primer embarazo, mayor es la probabilidad de la acumulación de un fenotipo carcinogénico en el epitelio mamario.

A medida que las células cancerosas se multiplican, ocurrirán cambios adicionales en el fenotipo en el material genético, ahora inestable. Como resultado, un proceso de selección natural permite a la célula cancerosa más exitosa proliferar al máximo y dominar la masa



cancerígena. A medida cambia el ambiente que rodea al cáncer, como ocurre con la terapia, el proceso de selección continúa.

Diversidad de las células cancerosas

Variación de la expresión genética.

Existe un amplio rango de combinaciones posibles de la expresión de los genes en la célula humana. Esto varía desde la célula normal hasta la célula cancerígena más atípica. Como resultado de los cambios genéticos descritos anteriormente, las células cancerosas desarrollan nuevas combinaciones de expresión de genes y por lo tanto nuevos fenotipos. La variación fenotípica ocurre no sólo de células cancerígenas a células normales, o de un tipo de cáncer a otro tipo de cáncer, sino también dentro de cánceres particulares y aun dentro de un mismo tumor. Por ejemplo, en pacientes con cáncer de mama hay una heterogeneidad de genes expresados por varias células; es decir, no todas las células expresan los mismos genes. Un ejemplo es la expresión heterogénea en tumores de mama de los genes para el receptor de estrógeno (ver adelante).

Expresión variable de genes y sus manifestaciones.

La expresión variable de los genes se debe a la gran diversidad biológica y bioquímica de las células cancerosas, consecuentemente varios marcadores tumorales no son necesariamente elaborados por todas las células cancerosas del mismo tipo o aun por un único cáncer en el tiempo. Esto es muy importante clínicamente cuando uno está tratando de determinar qué compuesto es indicado vigilar en el monitoreo de pacientes con una neoplasia maligna conocida. La diversidad celular dentro de un solo tumor también significa que las manifestaciones clínicas del cáncer, como la respuesta del tumor a una terapia dada, puede cambiar con el tiempo.

Manifestaciones clínicas.

Las manifestaciones clínicas del cáncer varían enormemente, dependiendo del tipo de tumor, del tejido afectado, y de la etapa de desarrollo tumoral. Por ejemplo, el cáncer del tubo gastrointestinal se manifiesta por obstrucción, hemoptisis, y defecación con sangrado. El cáncer de pulmón se manifiesta por hipoxia, dolor de pecho, y frecuentemente varios síntomas neurológicos. Las manifestaciones clínicas están relacionados con órganos. Por ejemplo, el cáncer de una glándula exocrina puede resultar en la producción de un exceso de hormona en con muchos efectos hormonales sistémicos. Nuevos síntomas se manifiestan con la propagación (metástasis) de las células cancerosas hacia otros órganos. El cáncer se propaga a través del sistema linfático y por la corriente sanguínea, resultando en metástasis en hígado, hueso y pulmón.

Tiempo como un factor

El cáncer como un proceso de largo plazo.

El cáncer es un proceso de largo plazo y progresa a través de cuatro fases obligatorias; una fase de inducción, una fase in situ, una fase de invasión, y una fase de diseminación. Durante la *fase de inducción*, la cual puede durar 30 años o más, las células están expuestas a uno o más carcinógenos. Estos carcinógenos en el ambiente pueden incluir radiación o varias



toxinas. Se ha estimado que aproximadamente tres cuartos de los cánceres humanos pueden ser causados o provocados por estos factores ambientales.

Actualmente se cree que puede ser necesario un período de muchos años después de la exposición antes de que un carcinógeno pueda tener su efecto en el huésped. Los cambios histológicos comienzan con displasia severa, que finalmente conduce al cáncer. Puede parecer obvio que no todos los individuos que están expuestos al mismo carcinógeno desarrollarán cáncer. Los factores adicionales que juegan un papel en decidir cuál individuo adquirirá cáncer incluyen susceptibilidad individual (genética) o tisular, presencia de otros carcinógenos o cocarcinógenos, el sitio al cual el carcinógeno puede actuar, la duración de la exposición (ver antes). A menudo, el tiempo entre la fase de inducción y la aparición clínica del cáncer puede ser hasta de 20 años.

Después de la inducción, le sigue la *fase in situ*. Esta fase representa el tiempo durante el cual la célula transformada realmente se desarrolla en un cáncer, pero el cáncer permanece localizado en el sitio original y no invade otros tejidos. Durante esta fase ocurre la selección clonal (ver antes) de aquellas células cancerosas que crecen más exitosamente.

La tercera fase es llamada la *fase de invasión*. Durante la fase de invasión las células malignas se multiplican e invaden los tejidos más profundos a través de la membrana de basamento, de ese modo van ganando acceso a las vesículas sanguíneas y a los canales linfáticos.

La cuarta fase es la de diseminación. Durante la *fase de diseminación*, la cual dura de 1 a 5 años, el cáncer invasivo se propaga a varias partes del cuerpo distantes del sitio de origen, generalmente a través de los sistemas sanguíneo y linfático. Para que el tumor crezca durante esta fase éste debe formar una nueva fuente sanguínea, para lo cual utiliza un proceso denominado *angiogénesis*.

Es crucial detectar el cáncer tempranamente, antes de la propagación metastásica. Idealmente el cáncer debe detectarse durante la fase de inducción. Sin embargo, esto es imposible porque antes de la fase in situ no hay certidumbre de si realmente el cáncer se desarrollará en el individuo. La siguiente estrategia es detectar el cáncer en la fase in situ. Esto ha sido realizado con gran éxito en pacientes con cáncer de cuello de útero. Aquí, la técnica de frotis Pap (Papanicolaou) ha sido de gran beneficio. Cuando el cáncer in situ del cuello uterino es detectado, el pronóstico es excelente. La mayoría de los cánceres son detectados durante la fase invasiva. Si la diseminación aún no ha ocurrido, el pronóstico es razonable. La detección de una propagación local con o sin involucramiento de los nódulos linfáticos a menudo lleva a la curación. Sin embargo, si ya ha ocurrido la diseminación, el pronóstico es muy pobre.

Invasión de los tejidos vecinos por las células cancerosas.

Varios factores juegan un papel en la detección de la capacidad del cáncer para invadir los tejidos vecinos. Tales factores incluyen movilidad aumentada de las células, presión aumentada causada por el tumor debido a la multiplicación activa de las células, elaboración de sustancias líticas por el cáncer, ausencia de los puentes intercelulares que se encuentran en todas las células normales, disminución de la cohesividad entre las células, y propagación finalmente de las células tumorales a los nódulos linfáticos regionales. Sin embargo, cuando las metástasis son aun microscópicas (micrometástasis), la capacidad del clínico para



detectarlas es muy limitada. Se ha estimado que aproximadamente la mitad de los pacientes que aparentan estar clínicamente libres de metástasis, de hecho tienen micrometástasis distantes no detectables en el momento del diagnóstico inicial y del tratamiento.

Cambio en la división celular.

El cáncer se manifiesta a menudo, por un cambio en la velocidad de la división celular. Aún cuando, la mayoría de los cánceres está asociada con una velocidad aumentada de la división celular, existen ejemplos en los que esto no siempre es así, como es el caso del nefroma.

Desdiferenciación celular.

Un fenómeno común del cáncer es la desdiferenciación, en que las células van desde un tipo celular más específico a un tipo celular más general mediante el proceso de selección clonal. Por consiguiente, no es inusual para las células cancerosas sintetizar varios compuestos que normalmente están presentes únicamente en los períodos embrionario o fetal. Por otro lado, las células a medida que se desdiferencian pueden perder ciertas propiedades celulares específicas, como la actividad de receptor o una actividad enzimática. Estos cambios fenotípicos pueden ser usados como indicadores de pronóstico.

Cambios cromosómicos en cáncer.

Los cambios cromosómicos en el cáncer han sido ampliamente estudiados en pacientes con leucemia, y varios tipos de leucemia han sido confirmados frecuentemente sobre la base de estos cambios cromosómicos.

Revisión de las Funciones de las Pruebas de Laboratorio

Detección (tamizaje)

Hay cuatro funciones principales en que las pruebas de laboratorio pueden servir en el campo de la neoplasia. Estos son detección o tamizaje, confirmación, clasificación (posicionamiento) y monitoreo.

La Tabla 49-3 establece algunas pruebas de tamizaje para la detección temprana del cáncer. La calidad de una prueba de tamizaje generalmente se expresa por su sensibilidad y especificidad clínicas (ver pág.375). Las observaciones de las pruebas de tamizaje están divididas en resultados negativos y positivos. Cada persona examinada es clasificada como una persona enferma o no enferma.

Una clasificación rígida de los resultados de las pruebas en resultados positivos y negativos puede ser algunas veces demasiado simplista. Los resultados de las pruebas de tamizaje en algunos casos pueden ser ordenadas desde muy negativas hasta muy positivas. Este último enfoque permite una interpretación más sofisticada de las pruebas en los programas reales de tamizaje. Por ejemplo, los pacientes cuyos resultados no son negativos pero al mismo tiempo no son suficientemente alarmantes para justificar una acción diagnóstica inmediata, pueden ser programados para tamizajes repetidos mas tempranos.[ref\(1910\)](#) Otro ejemplo es una política de tamizaje en etapas en que sólo los individuos con resultados positivos en la primera prueba de tamizaje están sujetos a pruebas de diagnóstico



posteriores.[ref\(1911\)](#)

Algunas veces el uso de más de una prueba de tamizaje puede parecer ventajoso. Sin embargo, la evaluación de la sensibilidad y especificidad de una combinación de pruebas de tamizaje basada en datos disponibles de las pruebas individuales, es complicada por el hecho de que usualmente dichas pruebas no son independientes desde el punto de vista estadístico. En general, es más eficaz combinar pruebas que son complementarios (es decir, dirigidas a características anatómicas y bioquímicas diferentes del tumor) que comparar pruebas dirigidas al mismo tipo de características.

Las pruebas complementarias incluyen examen citológico de esputo y examen torácico de rayos X de para el tamizaje de cáncer de pulmón.[ref\(1912\)](#) La palpación y la mamografía para el tamizaje de cáncer de mama son ejemplos de pruebas relacionadas. Ambos detectan tumores en su mayor parte basados en su tamaño. Un estudio[ref\(1913\)](#) mostró que cuando se realizaba mamografía, el examen físico demostró ser casi completamente redundante.

Confirmación

Las pruebas adicionales son usadas para confirmar la sospecha de cáncer basadas en síntomas o signos clínicos. Las pruebas que tienden a confirmar la presencia de un cáncer incluyen, por ejemplo, examen de la médula ósea para leucemia, catecolaminas urinarias para feocromocitoma, y α -fetoproteína para cáncer testicular. La confirmación de los resultados debe estar por encima de cierto nivel de decisión.[ref\(1914\)](#) Para que una prueba de laboratorio sea confirmatoria, ésta deberá poseer especificidad diagnóstica del 100%, lo que significa que no contenga resultados falsos positivos. Por ejemplo, todos los casos en que los niveles de catecolaminas están por encima de cierto valor deberían estar asociados con feocromocitoma.

Clasificación y reconocimiento de estadios

La clasificación de tumores es usada para describir los grados de diferenciación tumoral. Los tumores son clasificados como bien diferenciados, moderadamente bien diferenciados, y poco diferenciados. Los tumores poco diferenciados son más agresivos y tienen un pronóstico más pobre. Los patólogos quirúrgicos han desarrollado varios enfoques de reconocimiento del estadio basados en el tamaño y extensión de invasión de los tejidos circundantes por el tumor, el número de nódulos linfáticos positivos a células cancerosas, y la presencia o ausencia de metástasis. Esto ha sido llamado el sistema TNM (tumor, nódulos, metástasis).[ref\(1915\)](#) El propósito de dicha definición del estadio es dar estimaciones razonables de pronósticos (esto es, recurrencia del cáncer), de la respuesta apropiada para la terapia, o del curso probable de la enfermedad. Además de reconocer el estadio, basado en datos patológicos gruesos o microscópicos, sería de gran valor tener pruebas bioquímicas que pudieran clasificar apropiadamente los cánceres. Se ha sugerido que un elevado nivel de fosfatasa ácida prostática sérica, sí se mide por un procedimiento enzimático, puede indicar la presencia de un cáncer de próstata metastásico.

Monitoreo

La función más importante de las pruebas de laboratorio en el cáncer es monitorear el



curso de la enfermedad o su respuesta a la terapia. Winkel y cols.[ref\(1916\)](#) han desarrollado varias estrategias para monitorear pacientes que se sabe tienen cáncer de mama. El problema planteado fue predecir si un paciente pudiera tener recurrencia de esta enfermedad sobre la base de los valores secuenciales. Han sido usados otros enfoques para monitorear pacientes basados en el antígeno carcinoembrionario (ACE) en cáncer de colon,[ref\(1917\)](#) antígeno específico de próstata (AEP) para el cáncer de próstata[ref\(1918\)](#) y otros. Un aumento de los valores de ACE o AEP constituye una indicación para explorar al paciente quirúrgicamente de nuevo a fin de remover el cáncer remanente o cambiar el curso de la quimioterapia. Se supone que la producción de ACE o AEP por el tumor ha alcanzado proporciones clínicas, cuando los valores séricos para AEP o ACE alcanzan cierto umbral.

Las cuatro funciones principales: tamizaje, confirmación, clasificación y monitoreo constituyen posibles funciones para pruebas de laboratorio en la neoplasia.

Definición de un Marcador Tumoral Ideal

Coombes y Neville^{ref(1919)} han sugerido que el marcador tumoral ideal debe cumplir con los siguientes criterios:

1. Ser fácil y económico para medir en los fluidos corporales fácilmente disponibles.
2. Ser específico para el tumor estudiado y comúnmente asociado con éste.
3. Tener una relación estequiométrica entre los niveles plasmáticos del marcador y la masa tumoral.
4. Tener un nivel anormal en plasma, en orina, o ambos en presencia de micrometástasis, es decir, en una etapa en la cual ningún diagnóstico clínico o disponible en el momento presente, revelen su presencia.
5. Tener niveles estables en plasma, en orinas, o ambos y que no estén sujetos a grandes fluctuaciones.
6. Si está en el plasma de individuos saludables, exista a una concentración mucho mas baja que la encontrada en asociación con todos los estadios del cáncer.

Obviamente muchas investigaciones adicionales deben ser llevadas a cabo antes de que tales marcadores tumorales ideales sean encontrados. Sin embargo, es importante reconocer que la evaluación de un marcador tumoral como ideal debe relacionarse con el ambiente clínico.

Para esto, se ha sugerido que todos los marcadores tumorales deben también cumplir con los siguientes criterios principales.[ref\(1920\)](#)

1. Deben pronosticar un riesgo más alto o más bajo para un eventual desarrollo de recurrencia.
2. deben cambiar a medida que el estado actual del tumor cambia con el tiempo.
3. deberían preceder y predecir las recurrencias antes de que éstas sean clínicamente detectables

Además, si un marcador tumoral está siendo usado para detectar etapas muy tempranas del cáncer, debe haber disponible un tratamiento eficaz (ver adelante).

Todos los marcadores tumorales deben ser analizados de acuerdo al criterio que Coombes y Neville han presentado y de acuerdo a las consideraciones ya mencionadas. Para



que un marcador tumoral tenga algún valor, éste debe brindar información adicional de lo observado fácilmente sobre la base de un examen físico o histórico, y debe dar esta información con un margen de tiempo razonablemente largo como para permitir aplicar a tiempo una terapia apropiada. El margen de tiempo es el tiempo comprendido entre el tiempo en que el resultado de una prueba sea positivo y el tiempo en que la enfermedad sea clínicamente evidente o avanzada.

Ética del Proceso de Pruebas

Aun cuando un marcador tumoral puede ser usado para detectar la presencia de enfermedad, su uso no siempre puede ser benéfico. El cáncer de próstata, por ejemplo, está presente en alrededor del 40% de los hombres de 50 a 70 años, pero sólo alrededor del 4% de estos hombres morirán debido a la enfermedad misma. La razón es que el cáncer de próstata es generalmente de crecimiento lento y en la mayoría de los casos es más probable que un paciente muera por alguna otra causa, que debido a un cáncer de próstata. El tratamiento estándar para el cáncer de próstata, la intervención quirúrgica, quimioterapia y radiación pueden provocar efectos no deseables que incluyen impotencia, incontinencia, y la necesidad de colostomía. Además, un número significativo de pacientes puede morir debido a los mismos tratamientos. De este modo surge la pregunta ética: ¿debe ser usado el AEP para detectar el cáncer de próstata cuando la terapia representa un alto costo en morbilidad innecesaria y además no se ha demostrado su efecto en la prolongación de la vida en los pacientes?

Cambio del Compuesto Analizado en la Enfermedad

Clases de compuestos bioquímicos usados como marcadores tumorales (Tabla 49-4)

Esta sección es una revisión de algunas pruebas bioquímicas que han sido utilizadas tanto como marcadores tumorales primarios o como pruebas secundarias para detectar invasión o diseminación del cáncer. Los tipos de compuestos analizados están listados en el cuadro y son discutidos en términos de sus utilidades y aplicaciones clínicas. Este capítulo es una discusión de ensayos que son comúnmente usados o que parecen tener un valor potencial. La Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA por su acrónimo en inglés) regula cuáles marcadores tumorales pueden ser utilizados. Los marcadores tumorales proteicos aprobados por la FDA incluyen ACE, AFP, AEP, FAP, y AC-125. A medida que se vayan completando extensos ensayos clínicos, tales marcadores serán aprobados. Se recomienda profundizar en la lectura de las revisiones que abarcan algunos de estos ensayos en mayor profundidad.[ref\(1921\)](#)

Ejemplos de Marcadores Tumorales
Proteínas oncofetales Antígeno carcinoembrionario (CEA)



Alfa-fetoproteína (AFP)
Gonadotropina coriónica humana (GCh)
Antígeno SCC (carcinoma celular escamoso)

Glicoproteínas de mucina (antígeno carbohidratado)

CA-125
CA-19-9

Enzimas

Fosfatasa ácida prostática (FAP)
Antígeno prostático-específico (AEP)

Hormonas y receptores hormonales

ACTH y todas las otras hormonas exocrinas
Receptores de estrógeno y progesterona en mama

Proteína de superficie celular (aparte de los receptores)

Beta₂-microglobulina

Marcadores celulares

Oncogenes, tal como N-*ras*
Genes supresores, como p53

Antígenos oncofetales

Algunos de los antígenos oncofetales son medidos en el laboratorio por medio del uso de inmunoensayos; radioinmunoensayos de unión competitiva o ensayos inmunométricos en fase sólida, utilizando ya sea anticuerpos secundarios marcados con ¹²⁵I, enzimas y fluorescencia o con compuestos quimioluminiscentes. Estas proteínas NO son recomendadas para el tamizaje del cáncer.

Antígeno carcinoembrionario.

El ACE es una glucoproteína presente en el adenocarcinoma de colon y en el intestino fetal; esto fue descrito primero por Gold y Freedman.[ref\(1922\)](#) La detección de ACE en varios tejidos o en el suero es complicada por la presencia de antígenos de reacción cruzada con el ACE en estos tejidos.

En general, los niveles plasmáticos de ACE se elevan con el aumento en la edad y con el tabaquismo. Esto ha impedido el uso de niveles de ACE para el pronóstico de tamizajes generales.[ref\(1923\)](#) Los resultados de programas de tamizaje confinados a subpoblaciones con alto riesgo de desarrollar cáncer han sido igualmente desalentadores.[ref\(1924\)](#) Así, ni la sensibilidad ni la especificidad del ACE justifica su uso para el diagnóstico definitivo del cáncer.[ref\(1925\)](#)

En situaciones específicas, sin embargo, el ACE ha demostrado ser de valor diagnóstico. El ACE es útil, por ejemplo, para la detección del cáncer colorrectal primario[ref\(1926\)](#) cuando es utilizado en combinación con un enema de bario y con una imagen de radioyoduro para la detección de carcinoma metastásico de hígado. De acuerdo a la declaración consenso del Instituto Nacional de Cáncer,[ref\(1927\)](#) sólo los valores de cinco a diez veces por encima del límite de referencia normal en pacientes con síntomas deben ser

considerados fuertemente sugestivos de la presencia de cáncer. En algunos cánceres, incluyendo el cáncer de colon y el cáncer de mama, los niveles plasmáticos de ACE y la frecuencia de valores elevados están positivamente correlacionados con la severidad de la enfermedad cuando se evalúa el estadio clínico. Actualmente, el ACE está aprobado solamente para monitoreo del cáncer colorrectal.

El monitoreo postoperatorio de los niveles plasmáticos de ACE para la detección de recurrencia o metástasis ha demostrado ser útil en el cáncer colorrectal. La mayor parte de los médicos actualmente responden a valores de ACE sérico aumentados consecutivamente, realizando una segunda búsqueda en pacientes con cáncer colorrectal tratados quirúrgicamente. Un número significativo de pacientes se beneficia con una segunda intervención quirúrgica.[ref\(1928\)](#)

El ACE no está aprobado para el cáncer de mama porque los niveles de ACE postoperatorios son frecuentemente menos elevados en pacientes con cáncer de mama que desarrollan eventualmente enfermedad metastásica evidente que en los correspondientes pacientes operados por cáncer de colon. Solamente del 10% al 15% de los pacientes con cáncer de mama presentan niveles elevados de ACE plasmáticos por encima de los 10 µg/L.[ref\(1929\)](#)

Alfa-fetoproteína y gonadotropina coriónica humana.

La alfa-fetoproteína (AFP) es una glucoproteína oncofetal. En la vida embrionaria temprana es un componente predominante del suero proteico. Es sintetizada por el saco vitelino y después por el hígado fetal. Luego, durante la vida es producida principalmente en el hígado. La AFP fue reconocida primero como un marcador tumoral por Abele en 1963.[ref\(1930\)](#)

Los valores de AFP sérica deberían ser menores que 10 µg/L en sujetos saludables. Al comienzo de los desórdenes hepáticos, pueden observarse elevaciones moderadas (40 µg/L). Los valores por encima de 400 µg/L se asocian casi siempre con carcinoma hepatocelular, carcinoma de células germinales (como lo es el carcinoma testicular), hepatitis agresiva crónica, o necrosis hepática subaguda. Actualmente, la AFP es aprobada únicamente para uso en el carcinoma testicular.

La gonadotropina coriónica humana (GCH) es una hormona glucoproteica que comparte una actividad biológica indistinguible y una homología estructural extensa con su contraparte pituitaria, la hormona luteinizante humana (HLH).[ref\(1931\)](#) Aunque las subunidades α de HLH y GCH son esencialmente iguales, las subunidades β pueden diferenciarse mediante el uso de técnicas de inmunoensayos (ver capítulo 40). Los tumores de placenta y testículo que contienen tejido trofoblástico secretan cantidades excesivas de GCH. Ensayos específicos y sensibles han revelado que muchos cánceres también secretan GCH. Sin embargo, los datos [ref\(1932\)](#) disponibles muestran claramente que las determinaciones de GCH no son útiles para la detección del cáncer.

El principal uso clínico de AFP y GCH está relacionado con el diagnóstico, la terapia, y con el seguimiento del estudio de tumores de células germinales.[ref\(1933\)](#) La Tabla 49-5 presenta la clasificación de la Organización Mundial de la Salud de tumores de células germinales y marcadores asociados en tejidos y suero. En general, AFP y GCH proporcionan la mayor información acerca del estado del tumor cuando están persistentemente elevadas. Es



importante señalar que la ausencia de un marcador no excluye la presencia de tumores de células germinales.

Antígeno carbohidratado 19-9.

El antígeno carbohidratado 19-9 (AC-19-9) aparece en los tejidos como un monogangliósido y en el suero como mucina, una glucoproteína de alto peso molecular, rica en carbohidratos. Los resultados de estudios clínicos indican que los niveles en suero o plasma del AC-19-9 están frecuentemente aumentados en pacientes con carcinoma intra-abdominal. Su presencia se correlaciona notablemente con el cáncer de páncreas, para el cual los estudios tempranos han mostrado una sensibilidad del 90% y una especificidad del 85%. El AC-19-9 también puede hallarse aumentado con otros adenocarcinomas como son los de pulmón, gástrico, biliar y colon.

Antígeno carbohidratado 125.

El antígeno carbohidratado 125 (AC-125) sérico, un antígeno glucoproteico, está elevado en el suero de pacientes con cáncer de ovario. Las concentraciones elevadas del AC-125 fueron encontradas en algunos pacientes con cáncer ovárico epitelial y en teratoma ovárico. Los cambios en las concentraciones de AC-125 en suero durante la quimioterapia reflejaron el progreso de la enfermedad a medida que se valoraban por evidencia clínica y radiológica. Debe señalarse que el AC-125 no proporciona una ayuda real para el diagnóstico; sin embargo, éste tiene valor como marcador para el monitoreo de la respuesta a la quimioterapia.

Enzimas

Schwartz^{ref(1934)} revisó el uso de pruebas enzimáticas en el manejo de pacientes con cáncer. El cuadro presenta varias enzimas que han sido usadas para este propósito. Como con algunos presuntos marcadores tumorales discutidos en este capítulo, el uso de marcadores enzimáticos está lleno de dificultades. No todos los pacientes con un tipo particular de cáncer tienen elevaciones en una enzima (pobre sensibilidad), y algunas enfermedades no cancerosas están asociadas con aumentos en muchas de estas enzimas. Una excepción a esto es el AEP, que es una proteasa extracelular (ver adelante). Por lo tanto, los usos más frecuentes de estas enzimas son como marcadores objetivos para brindar estimaciones semicuantitativas de respuesta a terapia o como indicadores de pronóstico.

Enzimas Útiles en la Detección del Cáncer

Antígeno específico prostático (AEP)
Creatina cinasa BB (CC-BB)
Deoxinucleotidiltransferasa (TDT)
Enzimas pancreáticas
(amilasa, lipasa, ribonucleasa, tripsina)
Fosfatasa ácida (ACP)
Fosfatasa alcalina (FAL)
Fosfohexosa isomerasa (PHI)



Gama-glutamyltransferasa (GGT)
Glicosiltransferasas
Lactato deshidrogenasa (LD)
Lisozima (muramidasa) 5'-Nucleotidasa

Fosfatasa ácida.

Hay dos isoenzimas de las 13 conocidas para la fosfatasa ácida (FA) que parecen jugar papeles importantes en el manejo de pacientes con cáncer. La primera es la isoenzima prostática, y la segunda es la isoenzima ósea. La primera es inhibida por tartrato, mientras que la isoenzima ósea es resistente al tartrato.

La isoenzima de la fosfatasa ácida prostática (FAP) no ha demostrado ser útil para propósitos de diagnóstico.[ref\(1935\)](#) La mayoría de los ensayos investigados tienen bajas sensibilidades en los estadios tempranos del carcinoma prostático (A y B) (Tabla 49-6). El uso de algunos de estos ensayos para confirmar la presencia de carcinoma prostático en hombres con enfermedades urológicas también ha sido limitado.[ref\(1936\)](#) El uso primario de FAP es para ayudar a determinar la probabilidad de cáncer prostático metastásico.

Enzimas pancreáticas (amilasa, lipasa, ribonucleasa y tripsina).

Se han encontrado aumentos de la amilasa sérica en aproximadamente el 25% de los pacientes con cáncer pancreático. Desafortunadamente los ensayos con lipasa no aportan más información útil que la de los ensayos con amilasa. Varios investigadores han estudiado a la ribonucleasa como un marcador del cáncer de páncreas. Reddi y Holland[ref\(1937\)](#) observaron que esta enzima se elevó en el 90% de los pacientes con cáncer pancreático y en solamente un 10% de los pacientes con pancreatitis. Fitzgerald y cols.[ref\(1938\)](#) repitieron estos estudios y encontraron que el 50% de los pacientes con cáncer pancreático y, desafortunadamente, el 35% de los pacientes con enfermedades pancreáticas no cancerígenas tuvieron valores de ribonucleasa elevados.

La tripsina inmunorreactiva ha sido utilizada para el estudio de pacientes con cáncer pancreático. En un estudio, el total de los 17 pacientes con cáncer pancreático tuvieron una depuración renal elevada de tripsina inmunorreactiva, mientras que el 67% de los pacientes con pancreatitis aguda tuvieron valores elevados. Esto debería compararse con el hecho de que todos los pacientes con pancreatitis crónica tuvieron valores dentro del rango control.[ref\(1939\)](#)

Antígeno prostático específico.

El antígeno específico de próstata (AEP) es una proteasa glucoproteica encontrada en las células epiteliales de los conductos y acinos prostáticos. El AEP está elevado en los cuatro estadios del cáncer pancreático así como en la hipertrofia prostática benigna (HPB). Este es un ensayo mucho más sensible para el cáncer de próstata que el de la fosfatasa ácida prostática.[ref\(1940\)](#) Sin embargo, debido a que los niveles plasmáticos de AEP están elevados en la HPB, el AEP tiene una especificidad clínica relativamente pobre y no puede ser usada como la única para el diagnóstico de cáncer de próstata. Se ha recomendado usar el AEP para la detección del cáncer de próstata en combinación con un examen rectal directo. Sin embargo, la utilidad de cualquier forma de tamizaje para el cáncer de próstata ha presentado



controversias, ya que no se ha determinado el tratamiento apropiado para esta enfermedad. Si bien algunos argumentan que una espera vigilante es suficiente para la mayoría de los cánceres de próstata, otros ven como una cura la intervención inmediata, especialmente para los cánceres prostáticos pequeños e iniciales. Esta cuestión ética deberá resolverse con los ensayos clínicos que se están llevando a cabo.[ref\(1941\)](#)

Desoxinucleotidiltransferasa terminal.

La desoxinucleotidiltransferasa terminal (dTt) es una polimerasa que se encuentra en concentraciones altas en timos normales y en células leucémicas linfoblásticas agudas T, no-T, y no-B. En el diagnóstico inicial de leucemia linfoblástica aguda (ver abajo) se observan actividades altas de dTt en linfocitos sanguíneos periféricos y en médula ósea en la mayoría de los pacientes.

Otras enzimas (Tabla 49-7)

Las pruebas enzimáticas adicionales que puedan tener valor en pacientes con cáncer incluyen la fosfatasa alcalina, la cual está elevada en presencia de metástasis ósea o de hígado; elevaciones de la creatina cinasa BB en un pequeño porcentaje de pacientes con cáncer de pulmón; aumentos de la glutamiltransferasa II y 5' nucleotidasa en pacientes con cáncer pancreático; aumento de lactato deshidrogenasa (LDH), como la isoenzima LDH₅, en pacientes con metástasis en el hígado y de las isoenzimas LDH₂ y LDH₃ en pacientes con linfoma; y aumento de la lisozima (muramidasa) en pacientes con varios tipos de leucemia.

Productos de la degradación de la colágena

En pacientes con metástasis ósea de naturaleza osteolítica, hay un aumento en la excreción urinaria de hidroxiprolina e hidroxilisina. De hecho, la excreción de hidroxiprolina en orina es la menudo el primer signo de metástasis ósea en ciertas neoplasias malignas.

Marcadores celulares

Han sido identificados varios marcadores asociados con la membrana plasmática, citoplasma, o núcleo de células linfoides. Para esto se han utilizado varias técnicas. Estas técnicas, que tienden a ser de naturaleza inmunológica, incluyen rosetado, inmunofluorescencia, y pruebas inmunoenzimáticas. La técnica de rosetado está basada en una reacción entre un indicador celular (generalmente un eritrocito) y la célula linfoide para formar rosetas en casos en los cuales las células linfoides portan un marcador particular de membrana. Con dichas técnicas las células pueden ser mezcladas directamente, o la célula indicadora puede primero ser codificada con anticuerpo o complemento para demostrar receptores de la porción Fc de la inmunoglobulina o de los componentes del complemento. El uso de citometría de flujo en combinación con inmunofluorescencia ha demostrado ser una técnica poderosa para detectar marcadores celulares.

Esto muestra que los varios antígenos demostrados por estas técnicas no son específicos para tumores sino más bien antígenos de diferenciación asociados a tumores que representan la expresión de antígenos oncofetales normalmente no expresados por las células diferenciadas.



Las leucemias linfocitarias y los linfomas no-Hodgkin han sido subdivididos en subgrupos utilizados clínicamente sobre la base de marcadores bioquímicos celulares. La evidencia más notable del valor de tipificar linfocitos, con una batería de marcadores proviene de estudios de leucemia linfocítica aguda (LLA). La Tabla 49-8 muestra los cinco grupos de LLAs diferentes desde el punto de vista pronóstico y los marcadores relevantes para cada uno. Los grupos están ordenados de acuerdo al pronóstico. Las células de tipo B son caracterizadas por la presencia de inmunoglobulina de membrana de superficie (SmIg), como lo son las células B maduras normales. Las células de tipo T están caracterizadas por la presencia de receptores de eritrocitos de oveja y antígenos de timocitos humanos, como lo son las células T maduras. Las células de los tipos celulares pre-B están caracterizadas por una cadena pesada en IgM citoplásmica pero no por SmIg, la cual corresponde a las características de un estadio temprano durante la diferenciación de la célula B.

La desoxinucleotidiltransferasa terminal y el antígeno de LLA común son de valor no sólo por la clasificación de LLA (Tabla 49-8), sino también porque son muy útiles para distinguir la leucemia linfoblástica aguda y la leucemia mieloblástica.

La ALL puede ser clasificada en leucemia celular B (95%), la cual se caracteriza por las inmunoglobulinas monoclonales de baja densidad de superficie de membrana, generalmente IgM o IgM e IgD con una cadena liviana, y por la más rara, aunque también la más agresiva, T-LLA (5%). Las células del último tipo forman rosetas E y tienen antígenos T pero les falta SmIg.

Análisis de receptores esteroideos

Los ensayos de estrógenos y progesterona son útiles en el establecimiento del pronóstico en pacientes con cáncer de mama. [ref\(1942\)](#) Estos procedimientos evalúan la concentración relativa de los receptores para estrógenos y progesterona en tumores de mama extraídos durante la cirugía. Los individuos positivos para receptores de estrógenos y progesterona tienden a tener una esperanza de vida más larga y por consiguiente un mejor pronóstico que los individuos deficientes en estos receptores. Los receptores de estrógenos parecen ser los más importantes de los dos factores. La presencia o ausencia de receptores esteroideos puede ayudar a determinar el tipo de terapia. Para aquellas mujeres que no presentan receptores, debe utilizarse una terapia más agresiva, mientras que las mujeres con receptores estrogénicos pueden ser tratadas con terapia antiestrogénica con excelentes resultados.

Factores relacionados con la hemostasis

Los niveles del fibrinógeno plasmático están generalmente elevados en pacientes con cáncer. Sin embargo, en pacientes con coagulación intravascular diseminada (CID), se ha observado hipofibrinogenemia. Como se esperaba, CID está también asociado con valores decrecientes de antitrombina III (AT III). Por lo tanto, en pacientes con CID asociados con cáncer, los valores de AT III estarán disminuidos.

Se ha reportado un aumento de actividad fibrinolítica o fibrinogenolítica en pacientes con cáncer. Consecuentemente, los productos de degradación del fibrinógeno están a menudo elevados en el plasma u orina en pacientes con cáncer. Es interesante el hecho que los



activadores de plasminógeno están a menudo elevados en pacientes con cáncer.

Conclusiones

El enfoque de este problema es demasiado grande para ser cubierto por un capítulo en un libro de texto de química clínica. Más importante que enumerar simplemente todos los ensayos disponibles es el hecho de que hay un desafío que debe ser enfrentado para cualquier candidato a marcador tumoral. El desafío es que sea útil clínicamente en el manejo de pacientes con la enfermedad o que se sospeche que tengan la enfermedad. Desafortunadamente el panorama actual es muy pesimista. Se cree que con investigaciones futuras y pensamiento claro, serán posibles estrategias adicionales y nuevos marcadores.

Métodos de Análisis

Fosfatasa ácida

STEVEN A. NOEL

JOHN A. LOTT

Principios de análisis

Las fosfatasas que catalizan la hidrólisis de una variedad de ésteres de fosfato en un pH ácido son denominadas colectivamente fosfatasa ácida (FA). Las enzimas FA están ampliamente distribuidas en los tejidos humanos, donde las mayores concentraciones se encuentran en el hígado, bazo, eritrocitos, plaquetas, médula ósea, y glándula prostática. Por lo menos cuatro loci genéticos separados codifican las diferentes isoenzimas de FA.

La isoenzima FA más extensamente estudiada, es la fosfatasa ácida prostática (FAP). La FAP ha sido por mucho tiempo utilizada como una prueba para la detección o el monitoreo del carcinoma de próstata. Además, debido a que la FAP está presente en muy altas concentraciones en el semen, las mediciones de esta isoenzima son utilizadas en la investigación sobre casos de violaciones. Otras isoenzimas FA que han sido utilizadas para propósitos de diagnóstico clínico o de monitoreo son la FA eritrocitaria y FA ósea. La FA eritrocitaria es usada en estudios genéticos y familiares, mientras que el interés de la isoenzima ósea se atribuye a la actividad aumentada de la FA, encontrada en la enfermedad de Gaucher,[ref\(1943\)](#) leucemia de células vellosas,[ref\(1944\)](#) y en pacientes con actividad osteoclástica aumentada y reabsorción ósea.[refs\(1945\)](#)

Una multitud de ensayos han sido desarrollados para la medición de la actividad de FA. No se conoce el sustrato natural para la FA, y la variedad de sustratos que han sido utilizados en varios métodos para FA muestra diferencias en las especificidades de las isoenzimas de esta familia. Los métodos que se han desarrollado para FA son el resultado de los intentos para maximizar la sensibilidad y la especificidad del ensayo para una isoenzima FA particular. Desafortunadamente, ningún sustrato reacciona específicamente con una isoenzima particular.

Históricamente, las mediciones de la actividad de FA fueron realizadas usando modificaciones de los ensayos que habían sido previamente desarrollados para determinaciones de la actividad de FA. A menudo, la única modificación realizada fue cambiando el



amortiguador a un pH ácido. Uno de los primeros métodos empleó fenilfosfato como sustrato en un amortiguador de citrato a pH 4.8 (Tabla 49-9, método 1). Este procedimiento requería 3 horas de incubación, después de dicho tiempo la reacción se detenía por la adición de álcali, y el fenol liberado del sustrato por la acción de la FA se medía colorimétricamente usando el reactivo de Folin-Ciocalteu.

Otros sustratos que han sido utilizados incluyen β -glicerofostato, p-nitrofenil fosfato y α -naftilfosfato. Ninguno de estos sustratos son específicos para alguna isoenzima FA en particular, con la excepción de α -naftilfosfato, el cual muestra una buena especificidad para la FAP. Todos los sustratos mencionados antes, con la excepción del α -naftilfosfato, actualmente tienen uso limitado. El uso de métodos cinéticos utilizando sustratos que son más específicos para FAP ha sustituido estos métodos.

Los sustratos más populares para la medición de FA que están siendo usados ahora incluyen monofosfato de timolftaleína, α -naftilfosfato, y fosfato de metilumbeliferona.

El monofosfato de timolftaleína (Tabla 49-9, método 2) muestra mayor especificidad para FAP cuando se compara con las otras isoenzimas de FA. La FAP hidroliza el monofosfato de la timolftaleína y la timolftaleína liberada produce un color cuando se le agrega NaOH a la mezcla de reacción.[ref\(1946\)](#) La intensidad del color que se produce es directamente proporcional a la actividad de FA y puede ser medida colorimétricamente a 590 nm.

Los métodos para FA, que usan α -naftolfosfato (Tabla 49-9, método 3) como sustrato hacen uso de la reacción de α -naftol, liberado a partir de su éster fosfato, con 2-amino-5-clorotolueno-1,5-naftalina disulfonato (Fast Red TR) para formar un producto coloreado. Los métodos fluorimétricos para FA utilizan fosfato de 4-metilumbeliferona como sustrato (Tabla 49-9, método 4). La velocidad a la cual la metilumbeliferona es liberada por la acción de FA, es medida en un fluorímetro con una longitud de onda de excitación de 365 nm y una longitud de onda de emisión de 455 nm.

Los sustratos actualmente usados no son tan rápidamente hidrolizados por las isoenzimas FA no prostática cuando se compara con FAP. Además del uso de estos sustratos, la especificidad para FAP puede lograrse aún en un mayor grado por medio del uso de ciertos inhibidores enzimáticos. Un inhibidor comúnmente usado es L-tartrato, el cual inhibe la fracción de prostática FA. Se puede determinar la fracción prostática de FA mediante la medición de la actividad FA total y luego repitiendo el ensayo con tartrato incluido en la mezcla de reacción. La actividad de FAP que es inhibida por tartrato es calculada como la diferencia entre las dos mediciones. Sin embargo, debe señalarse que la medición de FA inhibida por tartrato no es enteramente específica para FAP porque otras isoenzimas FA muestran grados variables de inhibición por tartrato.[ref\(1947\)](#)

La utilización de los métodos inmunológicos para la determinación de FAP, está aumentando. Los radioinmunoensayos (Tabla 49-9, método 5) han sido desarrollados para hacer uso de anticuerpos monoespecíficos dirigidos contra FAP, los cuales se colocan sobre un soporte sólido como una esfera o tubo de polipropileno. Tanto el procedimiento fluorimétrico como el de inmunoensayo colorimétrico (Tabla 49-9, método 6) han ganado amplia aceptación debido a su especificidad para el FAP y de la conveniencia de su uso como resultado de la automatización. Uno de los procedimientos utiliza un inmunoensayo enzimático monoclonal dual de “sandwich”, mediante el cual el FAP de la muestra se une a un



anticuerpo unido a la superficie de la fase sólida. Esto es seguido por la adición de un segundo anticuerpo que ha sido conjugado con fosfatasa alcalina. Después de un paso de lavado para remover cualquier anticuerpo no unido, se agrega el metilumbeliferil fosfato como sustrato. Los ensayos inmunológicos de tipo “sandwich” emplean peroxidasa unida a anti-FAP como el segundo anticuerpo para formar el “sandwich”. La peroxidasa es utilizada para formar un cromóforo, y la intensidad de formación de color es proporcional a las concentraciones de FAP.

Especimen

Tanto el suero como el plasma heparinizado son muestras aceptables, aunque los resultados del plasma son generalmente menores que el suero debido a la liberación de FA por las plaquetas. El plasma obtenido de tubos que contienen EDTA es aceptable; sin embargo, se ha encontrado que el oxalato inhibe la actividad de FA.[ref\(1948\)](#) Otros compuestos que inhiben la actividad de FA incluyen fluoruro, fosfato en altas concentraciones, etanol y tartrato. La hemólisis en cantidades traza es tolerable, sin embargo, la hemólisis de moderada a extensa causa una sobreestimación significativa de FA debido a la liberación de la enzima de los eritrocitos.

La estabilidad de FA es dependiente del mantenimiento de un pH ácido. La FA es inactivada irreversiblemente cuando se guarda a temperatura ambiente y a un pH mayor que 6.0 por varias horas o más. Una vez que la FA es separada de las células sanguíneas, suero o plasma debe ser tratada mediante la adición de ácido cítrico o de ácido acético (5 mol/L) para mantener un pH de aproximadamente 5.4, en el cual la enzima es estable.

Intervalos de referencia

El intervalo de referencia para la actividad de FA en hombres y mujeres saludables es 0.5 a 1.9 U/L cuando se determina usando métodos que emplean como sustrato monofosfato de timolftaleína. Los factores biológicos que influyen en la actividad de FA total o resistente a tartrato incluyen edad, sexo, madurez sexual, y estado hormonal en las mujeres, esencialmente, pubertad y menopausia. Los intervalos de referencia basados en estos factores han sido propuestos y descritos en otra parte.[ref\(1949\)](#)

Beta₂-Microglobulina

DONALD T. FORMAN

Principios de análisis

La beta₂-microglobulina (β_2M) es una proteína con una masa molecular de 11,800 daltones.[ref\(1950\)](#) La β_2M se compone de la cadena ligera de antígeno de clase I del complejo de histocompatibilidad mayor (HLA), está unida no covalentemente a las cadenas pesadas del HLA, y se encuentra presente en la superficie de todas las células nucleadas.[ref\(1951\)](#) Varios fluidos biológicos presentan pequeñas cantidades de β_2M después de su disociación de la cadena pesada de HLA.[refs\(1952\)](#) La concentración de β_2M en suero está afectada por el recambio de las células nucleadas, la función renal, y la activación inmune.[ref\(1953\)](#) Se encuentran concentraciones aumentadas de β_2M en suero de pacientes con neoplasias



malignas, enfermedades renales caracterizadas por filtración glomerular reducida, y diversas condiciones infecciosas incluyendo infección con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH).[refs\(1954\)](#) En pacientes con mieloma múltiple, la β_2 M sérica ha resultado ser el indicador simple de pronóstico más poderoso.[ref\(1955\)](#)

Los métodos actuales que han sido descritos para la medición de β_2 M, son todos procedimientos inmunoquímicos (ver capítulo 11-13); inmunodifusión radial (IR), radioinmunoanálisis (RIA), ensayos inmunonefelométricos y turbidimétricos, inmunoensayos enzimáticos, y fluoroinmunoensayos. La mayoría de estos métodos hacen uso de antisuero policlonal; sin embargo, también ha sido descrito el uso de anticuerpos monoclonales.[ref\(1956\)](#) Aunque la secuencia de aminoácidos de β_2 M tiene un grado considerable de homología con la región constante (C_{H3}) de la inmunoglobulina G, la β_2 M no está inmunológicamente relacionada con las inmunoglobulinas, y el antisuero (monoclonal o policlonal) preparado contra la β_2 M no produce reacción cruzada con las inmunoglobulinas.

Históricamente, la medición de β_2 M fue realizada por inmunodifusión radial (Tabla 49-10, método 1). El ensayo de IR es el menos sensible de los ensayos desarrollados para β_2 M, y además, requiere tiempos de incubación prolongados.

Se han descrito procedimientos inmunturbidimétricos[ref\(1957\)](#) para β_2 M. Estos ensayos pueden ser adaptados a una variedad de instrumentos automáticos. El pretratamiento de la muestra con polietilenglicol puede ser necesario para remover lipoproteínas, inmunoglobulinas, y otras proteínas que pueden ser precipitadas e interferir con las mediciones de β_2 M durante el ensayo.[ref\(1958\)](#)

Los ensayos inmunonefelométricos[ref\(1959\)](#) para la β_2 M basados en la cantidad de luz dispersada, han sido automatizados. La sensibilidad de estos ensayos ha sido aumentada por el uso de micropartículas de látex (diámetro 0,1 μ m) cubiertas con anticuerpo dirigido contra β_2 M (Tabla 49-10, método 2). Las muestras lipémicas muy turbias deben ser clarificadas antes del análisis. Los métodos inmunturbidimétricos e inmunonefelométricos son rápidos, precisos, y exactos para las mediciones de β_2 M en suero. Sin embargo, estos métodos son relativamente insensibles para detectar β_2 M en orina de personas saludables sin un paso de concentración previo.

La β_2 M es frecuentemente medida con los métodos de RIA (Tabla 49-10, método 3).[ref\(1960\)](#) Los métodos de RIA pueden medir exactamente cantidades de nanogramos de β_2 M en suero y orina sin preconcentración de la muestra. Los tipos de procedimientos de RIA que han sido desarrollados incluyen el uso de un soporte en fase sólida, donde, por ejemplo, la β_2 M en el suero de los pacientes compete con una cantidad fija de β_2 M marcada por unión a anticuerpos anti- β_2 M que han sido unidos a partículas de Sephadex.[ref\(1961\)](#) También se han implementado RIAs tradicionales para β_2 M, mediante los cuales, β_2 M y β_2 M marcada compiten por una cantidad limitada del anticuerpo.[ref\(1962\)](#) Los complejos antígeno-anticuerpo resultantes son luego precipitados por un segundo anticuerpo, y se mide la radioactividad del precipitado. La cantidad de radioactividad está inversamente relacionada con las concentraciones de β_2 M sérica o urinaria.

Se ha desarrollado un método inmunofluorimétrico para β_2 M que ya se encuentra comercialmente disponible (Tabla 49-10, método 4).[ref\(1963\)](#) Este ensayo está basado en la

competencia entre β_2 M marcada con europio y β_2 M de la muestra para unirse a anticuerpos monoclonales específicos. Los complejos anticuerpo monoclonal- β_2 M son detectados por un segundo anticuerpo unido a un soporte de fase sólida. La adición de una solución de realce al sistema de reacción causa la disociación de los iones de europio de los complejos inmunes marcados. Los iones de europio disociados forman quelatos altamente fluorescentes; el grado de fluorescencia es inversamente proporcional a las concentraciones de β_2 M de la muestra.

Los procedimientos de inmunoanálisis enzimáticos (IAE) de alta sensibilidad y exactitud (Tabla 49-10, método 5) han sido desarrollados y están comercialmente disponibles.^{ref(1964)} Las muestras que contienen β_2 M compiten con β_2 M conjugada a una enzima (β -galactosidasa o peroxidasa de rábano) y unida covalentemente a un soporte sólido, como las partículas de Sephadex o una placa de microvaloración. Después de un período de incubación, todo lo que no esté unido al complejo enzima- β_2 M es removido por lavado, y es agregado un sustrato enzimático adecuado al sistema. El trazador enzimático unido es medido monitoreando la cantidad de sustrato que es convertida a producto, el cual puede medirse espectrofotométricamente. La actividad enzimática es inversamente proporcional a la concentración de β_2 M de la muestra.

También es posible, un ensayo de ELISA automático basado en la fluorescencia del sustrato hidrolizado de galactosa umbeliferona con la enzima β -galactosidasa marcada.

Especimen

El suero y plasma colectados en heparinato de sodio producen resultados comparables.^{ref(1965)} Las muestras pueden ser guardadas por una semana de 2° a 8° C o por más de un año a -20° C. También puede ser medida la β_2 M en líquido cefalorraquídeo (LCR) y es útil para el monitoreo de pacientes con neoplasia maligna o con infección por HIV.

El análisis de β_2 M en muestras de orina es problemático. Se sabe que la β_2 M no es estable en orina, y el grado de inestabilidad depende de factores tales como el pH urinario y la temperatura.^{ref(1966)} Para mejores resultados la orina debe ser refrigerada y alcalinizada tan pronto como sea posible después de la toma de muestra. Las muestras de orina tomadas adecuadamente y alcalinizadas pueden ser guardadas por 2 días de 2° a 8° C o por más de 2 meses a -20° C.

Intervalo de referencia

Las concentraciones de β_2 M en suero y plasma están reportadas como independientes de la masa corporal y del sexo pero son moderadamente más altas en la vejez.^{ref(1967)} El intervalo de referencia para la β_2 M en el suero de individuos saludables varía un poco dependiendo del tipo de método usado para su medición. Se ha reportado un intervalo de referencia del 95% de 0.95 a 2.78 mg/L mediante el uso de un ensayo inmunofluorométrico,^{ref(1968)} mientras que la medición nefelométrica de β_2 M produce un intervalo de referencia al 95% de 0.87 a 2.42 mg/L.^{ref(1969)} El intervalo de referencia de β_2 M en LCR es idéntico al que se obtiene en suero.^{ref(1970)} Han sido encontradas concentraciones de β_2 M en orina para individuos saludables con un promedio de 98 μ g/L y un límite superior (+ 2 DE) de 320 μ g/L.^{ref(1971)}



Antígenos carcinoembrionarios (ACE)

GREGORY A. HOBES

Principios de análisis y uso actual

La medición del antígeno carcinoembrionario (ACE) es utilizada comúnmente como marcador tumoral para el monitoreo de pacientes con cáncer colorrectal. Las concentraciones aumentadas de ACE en suero también son encontradas en pacientes con otros tipos de cáncer, en pacientes con enfermedades hepatobiliares benignas y algunas inflamatorias, y en fumadores.[ref\(1972\)](#) El ACE es un término colectivo usado para describir una familia de moléculas asociadas al cáncer. La molécula no es homogénea en términos de sus epítopes antigénicos[ref\(1973\)](#) y la medición de ACE por diferentes técnicas de inmunoensayo involucra diferentes anticuerpos como reactivos proporcionando a menudo valores discrepantes de ACE.[ref\(1974\)](#)

La primera técnica para medir ACE fue el radioinmunoensayo (RIA), que aun es usada hoy en día (Tabla 49-11, método 1). Los RIAs para ACE deben emplear un paso de extracción que remueve glucoproteínas, como el ACE, dentro de la fase fluida, mientras que precipitan la mayoría de las otras proteínas séricas que podrían causar uniones proteicas no específicas. Los ensayos que emplean un paso de extracción se denominan ensayos *indirectos*. Característicamente se requiere el ensayo directo de ACE (no se utiliza paso de extracción) para muestras que contengan más de 20 ng/mL de ACE cuando la sensibilidad del ensayo no es crítica.

La extracción de ACE puede llevarse a cabo usando ácido perclórico, calor, o ambos. Estas técnicas llevan a la pérdida de algo de ACE inmunorreactivo. El ácido perclórico, más no la extracción por calor, también libera ACE de los complejos inmunes, permitiendo un ensayo más sensible. Si bien el uso de ácido perclórico permite un ensayo más sensible, se requiere quitar el ácido antes de que ocurra el ensayo de ACE. Los métodos para remover el ácido incluyen diálisis, gel de exclusión por cromatografía, o ultrafiltración.

Los métodos inmunoquímicos para ACE que emplean anticuerpos dirigidos hacia el ACE que está irreversiblemente unido al soporte de fase sólida son los ensayos de uso más común (Tabla 49-11, método 2). El ACE es unido por un anticuerpo de captura seguido por la adición de un segundo anticuerpo anti-ACE conteniendo la enzima marcada para formar un complejo de tipo "sandwich". La proteína no específica unida es eliminada por el uso de una serie de pasos de lavado realizados antes de la adición del segundo anticuerpo. La adición del sustrato que puede reaccionar con la marca enzimática para generar un producto que puede ser medido por espectrofotometría completa el ensayo.

La variedad de estuches de ensayo que están disponibles comercialmente pueden emplear anticuerpos con grados diferentes de especificidad. Este hecho hace difícil para los laboratorios cambiar un método de ACE por otro, sin ocasionar que la interpretación de los resultados sea dificultosa para los médicos. Además, las diferencias en la forma de extracción (calor versus ácido) utilizada en los métodos indirectos, así como las diferencias en los valores de ACE medidas por métodos directos versus métodos indirectos, contribuyen a las diferencias en los resultados cuantitativos obtenidos con los diversos análisis disponibles.

Especimen

2028



El EDTA del plasma es la muestra preferida para los análisis de ACE. El suero contiene la enzima proteolítica plasmina, la cual puede inactivar al ACE. El plasma necesita calcio como cofactor para la actividad. De este modo, es necesario el plasma anticoagulado con EDTA, para remover calcio. Las muestras deberían ser centrifugadas e inmediatamente congeladas a -20°C para evitar la degradación proteolítica del ACE. Si ha sido colectado suero, cualquier muestra remanente debe ser guardada de 0 a 4°C durante el análisis en caso de que fuera necesario repetir el ensayo.

Intervalo de referencia

El intervalo de referencia para ACE en individuos saludables depende de los métodos usados para las mediciones y por el estado de fumador del paciente. Ha sido previamente establecido un intervalo de referencia más alto de 2.5 ng/mL para ACE cuando éste se mide por RIA. [ref\(1975\)](#) En fumadores, saludables en los demás aspectos, pueden apreciarse los valores hasta de 5.0 ng/mL . Cuando el ACE es medido por inmunoensayo enzimático puede ser apropiada una referencia mayor de aproximadamente 4.0 ng/mL . [ref\(1976\)](#)

Inmunoelectroforesis

STEVEN C. KAZMIERCZAK

Principios de análisis

La *inmunoelectroforesis* (Tabla 49-12, método 1) es un tipo muy común de técnica que se usa en los laboratorios clínicos hoy en día para la identificación de proteínas, especialmente las *gammopatías monoclonales*. Este método es a menudo realizado con un medio de soporte sólido de gel de agarosa. Las muestras de los pacientes son separadas por electroforesis zonal en sus fracciones de proteínas habituales. Luego es colocado un antisuero de especificidad apropiada en un carril que corra paralelo a las proteínas separadas. La difusión de antígenos y anticuerpos de uno hacia el otro, resulta en la formación de los arcos de precipitina. La forma del arco y la posición de la migración del arco desde el origen puede ser comparado con un suero control permitiendo la identificación de la proteína de interés. Vea el capítulo 12 para detalles adicionales sobre este método, y la Fig. 12-2 para un ejemplo de esta técnica.

La electroforesis por inmunofijación (Tabla 49-12, método 2) elimina el prolongado tiempo de difusión requerido para la reacción antígeno-anticuerpo intrínseca del método de identificación de proteínas por inmunoelectroforesis. Este procedimiento, al igual que la inmunoelectroforesis, requiere primero de la separación de proteínas por electroforesis de zona. Después, el antisuero monoespecífico es colocado sobre la zona ocupada por la proteína de interés. Después de un período de incubación, el exceso de antisuero es removido del gel por lavado, y la banda de precipitación del antígeno-anticuerpo que permanece es teñida. Esta técnica es más sensible que la inmunoelectroforesis para la detección de proteínas monoclonales. La identificación de proteínas usando el análisis de inmunotransferencia western es un tipo de procedimiento de inmunofijación.

Especimen



El suero, orina, u otros fluidos corporales son muestras aceptables para realizar la inmunoelectroforesis. Si se usa plasma, la presencia de fibrinógeno en la muestra puede ser erróneamente interpretada como una banda monoclonal. Si el análisis es demorado más de 48 horas, las muestras deben ser congeladas. Las muestras que normalmente contienen bajas concentraciones de proteínas, como orina o líquido cefalorraquídeo, necesitan ser concentradas antes del análisis.

Cuantificación de inmunoglobulinas

GAYLE JACKSON

Principios de análisis

Las inmunoglobulinas en suero, orina, y otros fluidos corporales pueden ser medidas por una variedad de técnicas semicuantitativas o cuantitativas. Los métodos semicuantitativos miden inmunoglobulinas como la fracción de globulinas totales presentes en la muestra, mientras que los métodos cuantitativos determinan la concentración de cada una de las clases individuales de inmunoglobulinas.

La valoración semicuantitativa de las inmunoglobulinas en suero es realizada más frecuentemente usando separación electroforética de globulinas totales en sus componentes globulinas alfa, beta y gama. Debido a que la fracción gama consiste casi enteramente de inmunoglobulinas, esta técnica permite una valoración bastante buena de la concentración de inmunoglobulinas totales. Este método también sirve como un buen procedimiento de tamizaje para la detección de inmunoglobulinas monoclonales.

La medición cuantitativa de cada una de las clases de inmunoglobulinas (Ig) ha sido posible por el desarrollo de anticuerpos dirigidos hacia cada clase (IgG, IgM, IgA, IgD, e IgE). Una variedad de procedimientos inmunoquímicos ha sido desarrollada para la cuantificación de estas clases de inmunoglobulinas debido a la gran diferencia en las concentraciones de cada clase de inmunoglobulinas. Por ejemplo, puede existir una diferencia de hasta un millón de veces entre las concentraciones séricas de IgG e IgE.

La técnica de inmunodifusión radial (Tabla 49-13, método 1) es comúnmente usada en los laboratorios clínicos para la medición de las concentraciones de IgG, IgM, o IgA. Este método está descrito en detalle en la pág. 236. La sensibilidad de este método para las diferentes fracciones de inmunoglobulinas es dependiente de la concentración de anticuerpo incorporado en el gel. Las placas de inmunodifusión de nivel estándar tienen sensibilidades para IgG, IgM, e IGA de aproximadamente 4 g/L, 300 mg/L, y 600 mg/L respectivamente, mientras que las placas de inmunodifusión de nivel bajo tienen sensibilidades para IgG, IgM, e IgA de aproximadamente 20, 25, y 20 mg/L respectivamente. Los métodos de inmunodifusión radial son precisos pero tienen la desventaja de ser lentos y muy tediosos. Por consiguiente, estos métodos son más adecuados para ser utilizados cuando se necesita analizar un número limitado de muestras.

El método más común en uso para la cuantificación de las inmunoglobulinas IgG, IgM, e IgA es la inmunonefelometría (Tabla 49-13, método 2). En este procedimiento la inmunoglobulina reacciona con su anticuerpo específico para formar un complejo inmunoprecipitado que produce un aumento de la dispersión de luz. La cantidad de dispersión de luz es proporcional a la concentración de inmunoglobulina dentro de la muestra. Las



muestras que están turbias necesitan ser filtradas para remover la turbidez antes del análisis. Otro procedimiento común usado para la determinación de inmunoglobulinas es la turbidimetría (Tabla 49-13, método 3). Este método es similar a la inmunonefelometría excepto que el aumento en absorbancia es utilizado para calcular la concentración de inmunoglobulina. Pueden ser tomadas las mediciones de absorbancia después de completarse la reacción o a intervalos de tiempo seleccionados durante el ensayo.[ref\(1977\)](#) Ver capítulo 12 para detalles de ambos métodos.

Las concentraciones habituales de IgD (300 µg/mL) y de IgE (2 a 2000 ng/mL) están por debajo de los límites de detección para las técnicas de ensayo descritas arriba. Generalmente la medición de IgD no es indicada, excepto en los casos en que se sospecha la producción de IgD monoclonal por malignidad de las células plasmáticas.

La medición de las concentraciones de IgE es frecuentemente realizada como consecuencia de una reacción alérgica. Una modificación de la técnica de inmunonefelométrica de turbidimetría aumentada por partícula (TAP) permite la medición de IgE. Esta modificación emplea anticuerpo anti-IgE covalentemente unido a pequeñas partículas de latex. Estas partículas de tamaño uniforme dispersan la luz mejor que los inmunocomplejos y de este modo proporciona la sensibilidad necesaria para medir IgE.

Las técnicas más frecuentemente usadas para medir las concentraciones relativamente bajas de IgE son el ensayo radioinmunométrico y el inmunoensayo enzimático. La técnica de radioinmunométrica comúnmente usada para medir IgE es una prueba radioinmunoabsorbente en papel. Esta técnica emplea anti-IgE inmovilizada en papel, la cual reacciona con IgE presente en la muestra. Después de un período de incubación seguido por un paso de lavado para remover el exceso de suero, se agrega ¹²⁵I-anti-IgE formando un “sandwich” con los complejos IgE/anti-IgE.

Los métodos de inmunoensayos enzimáticos usados para medir IgE incluyen el ELISA. En esta técnica, la muestra es incubada en tubos cubiertos con anti-IgE seguido por la adición de anti-E marcado con peroxidasa. La adición del sustrato de la enzima causa la formación de color, el cual puede ser medido en un espectrofotómetro.

Especimen

El suero es la muestra que se usa con más frecuencia para la cuantificación de inmunoglobulinas. Sin embargo, el líquido cefalorraquídeo y la orina también son frecuentemente analizados. Las muestras de orina deben ser concentradas aproximadamente de 20 a 50 veces antes de ser evaluadas por electroforesis o inmunolectroforesis.

Las muestras son estables hasta por 5 días de 2 a 8° C. Por períodos más largos de almacenamiento, se recomienda congelarse a temperaturas menores de -20 C. El recongelamiento de muestras descongeladas no es recomendable debido al alto riesgo de desnaturalización de proteínas.

Intervalo de referencia

Los intervalos de referencia normales para las inmunoglobulinas en suero estratificado por la edad se muestran en la Tabla 49-14.



Antígeno prostático específico

WILLIAM R. JOHNSON

JOHN A. LOTT

Principios de análisis

El antígeno específico de próstata (AEP) es una glucoproteína producida por las células epiteliales de la glándula prostática así como también por las glándulas periuretral y perirrectal.[ref\(1978\)](#) Debido a que el AEP es una proteasa sérica, dicho antígeno está unido a inhibidores de proteasas en suero, como α_2 -macroglobulina y α_1 -antiquimiotripsina. La unión de AEP a la α_2 -macroglobulina representa ocasiona que AEP no sea detectable por los procedimientos de inmunoensayos corrientes. Sin embargo, la unión de AEP a α_1 -antiquimiotripsina resulta en la formación de un complejo que es detectable por los inmunoensayos habituales de AEP. Además de este complejo inhibidor proteasa-AEP, el suero también contiene AEP no unido, que también es detectable por inmunoensayos de AEP. La dificultad más común para los métodos de AEP consiste en reconciliar la estandarización de los diferentes métodos, usando anticuerpos que reconozcan las diversas formas de AEP en diferentes grados y por lo tanto que no produzcan los mismos resultados en todas las muestras.

Las técnicas para la medición de AEP pueden ser descritas como métodos estándares y métodos ultrasensibles.[ref\(1979\)](#) Los métodos estándares fueron los primeros procedimientos de inmunoensayos desarrollados para las mediciones de AEP. Usando estos ensayos, la detección de AEP por encima del límite de detección biológica a menudo correspondía a la presencia de residuos tumorales después de la intervención quirúrgica.[ref\(1980\)](#) El límite de detección biológica está definido como el límite inferior de detección del ensayo más dos desviaciones estándar provenientes de los datos de precisión interensayos.[ref\(1981\)](#) Usando este punto de corte, el cual fue típicamente establecido en $<0.4 \mu\text{g/L}$ para los ensayos estándar, aproximadamente del 40% al 60% de los pacientes sometidos a prostatectomía radical “curativa” y cuyos niveles de AEP séricos estuvieron por debajo del valor de corte de los ensayos estándar a los 6 meses, mostraron evidencia de enfermedad progresiva residual.

El desarrollo del procedimiento ultrasensible de AEP capaz de medir con exactitud menos de $0.1 \mu\text{g/L}$ ofrece ventajas sobre los ensayos de AEP estándar, que incluyen (1) la identificación temprana de enfermedad residual en pacientes que experimentaron prostatectomía radical, (2) la evaluación de la virulencia de la enfermedad residual mediante la valoración del doble de AEP dentro del rango ultrasensible, y (3) la garantía que pacientes con concentraciones de AEP por debajo de una cierta concentración por un período extendido de tiempo, tendrían baja probabilidad de desarrollar enfermedad progresiva.[ref\(1982\)](#)

Los primeros ensayos comerciales para AEP fueron el radioinmunoensayo (RIA) y los ensayos inmunoradiométricos (EIRM).[ref\(1983\)](#) El procedimiento RIA (Tabla 49-15, método 1) utilizaba un anticuerpo policlonal en un formato de ensayo tradicional de unión competitiva. El procedimiento EIRM (Tabla 49-15, método 2) ha sido reemplazado con ensayos inmunométricos empleando marcadores no isotópicos.[ref\(1984\)](#)

El procedimiento más común actualmente en uso para AEP está basado en un inmunoensayo enzimático de captura de micropartícula, (Tabla 49-15, método 3). En este procedimiento, el anticuerpo monoclonal dirigido a AEP está cubierto dentro de



micropartículas inertes. El AEP presente en la muestra se une a las micropartículas. Enseguida estas micropartículas son atrapadas en una matriz de fibra de vidrio donde un segundo anticuerpo marcado enzimáticamente se une al AEP formando un complejo sandwich. Se agrega el sustrato de la enzima, y éste reacciona con la enzima unida. Se mide el producto, el cual está directamente relacionado a la concentración de AEP.

Otro procedimiento popular de inmunoensayo es una versión de inmunoensayo enzimático del procedimiento EIRM previamente descrito como método 2 en la Tabla 49-11 (Tabla 49-15, método 4). En este procedimiento EIE, el marcador es la fosfatasa alcalina (FAL) en lugar de ^{125}I . La reacción del p-nitrofenil fosfato con FAL produce p-nitrofenol, el cual es monitoreado bicromáticamente a 405 y 450 nm.

Otros procedimientos inmunométricos no radioisotópicos para AEP incluyen inmunoensayos enzimáticos fluorescentes que usan anticuerpo marcado con la enzima dirigido contra AEP adherido a papel de fibra de vidrio (Baxter-Dade, Miami, Florida) o esferas magnéticas (Tososh, san Francisco, California), y un ensayo bioluminiscente (Ciba-Corning).

Especimen

El suero es la muestra de elección para la medición de AEP. Además del suero, AEP también ha sido medido en orina.[ref\(1985\)](#) Las concentraciones de AEP en orina reflejan tejidos prostáticos residuales en pacientes prostatectomizados. Se ha encontrado que AEP estable hasta 4 días a temperatura ambiente y hasta 6 meses a -20 C .[ref\(1986\)](#) El efecto del congelamiento y descongelamiento sobre las concentraciones de AEP es materia de discusión. Se han reportado aumentos, descensos, y no efectos en los ciclos de congelamiento y descongelamiento.[refs\(1987\)](#) Actualmente, se recomienda evitar repetir el congelamiento y descongelamiento de las muestras.

Intervalo de referencia.

El AEP está presente en bajas concentraciones en el suero de hombres saludables. Cuando es usado como una herramienta de tamizaje, un valor de AEP de $>4.0\text{ }\mu\text{g/L}$ pero $<10\text{ }\mu\text{g/L}$ sugiere más una hipertrofia prostática benigna que un riesgo significativo de cáncer de próstata. Los pacientes con niveles de AEP entre 10 y $20\text{ }\mu\text{g/L}$ tienen aún un riesgo mayor para cáncer de próstata, y este intervalo identifica aquellos pacientes que pueden requerir evaluaciones adicionales y posible biopsia.[ref\(1988\)](#) Los niveles de AEP $>20\text{ }\mu\text{g/L}$ generalmente se asocian con el cáncer prostático. Cuando el AEP es usado para establecer la recurrencia de la enfermedad después de una prostatectomía radical, se ha sugerido $0.5\text{ }\mu\text{g/L}$ como valor de decisión médica.[ref\(1989\)](#)

Electroforesis de proteínas séricas

DAVID A. SMITH

JOHN A. LOTT

Principios de análisis y uso actual

El suero humano contiene una enorme diversidad de proteínas incluyendo desde hormonas polipeptídicas simples hasta proteínas grandes y complejas como las inmunoglobulinas. Puede ser empleada una variedad de técnicas para diferenciar el gran



número de proteínas presentes en el suero. Métodos altamente sensibles como la electroforesis bidimensional acoplada con métodos de tinción mejorados pueden distinguir más de 500 proteínas séricas diferentes. Sin embargo, en el típico laboratorio clínico el término “proteínas séricas” generalmente se refiere a la docena de proteínas o más que están en concentraciones lo suficientemente grandes como para ser detectadas por el método de electroforesis comúnmente usado para separación de proteínas y métodos de unión a colorantes para la visualización de las fracciones de proteínas individuales.

Históricamente, la diferenciación de proteínas en el suero estuvo basada en su caracterización dentro cualquier de las dos categorías denominadas *albúmina* y *globulinas*. Esta clasificación estuvo basada en el hallazgo de que la adición de sales al suero causaba la precipitación preferencial de globulinas. La separación de la sal por diálisis seguida de evaporación del sobrenadante producía la formación de un residuo blanco denominado *albúmina*.

La técnica más común para separación de proteínas en suero es la electroforesis. Este método está basado en el principio de que cuando una corriente es aplicada a un medio que contenga partículas cargadas, aquellas partículas con una carga negativa migrarán hacia el electrodo positivo y aquellas partículas con una carga positiva migrarán hacia el electrodo negativo.

La matriz del soporte es el medio a través del cual las proteínas migran durante el proceso electroforético. Los medios de soporte pueden ser de varios tipos. Los medios utilizados pueden separar proteínas en base a la carga molecular solamente, o en base tanto a la carga molecular como al tamaño. El medio de soporte comúnmente usado que separa proteínas en base a la carga molecular incluye tanto agarosa como acetato de celulosa. El medio de soporte usado para separar proteínas en base al tamaño y carga incluye los geles de almidón y de poliacrilamida; estos medios son porosos y por lo tanto impiden la migración de las moléculas de proteínas más grandes, mientras que las moléculas más pequeñas migran sin obstáculos. Esto es posible para la separación de moléculas con diferente tamaño pero con idéntica relación de carga a masa.

Las proteínas pueden tener una carga positiva o negativa, o no estar cargadas, dependiendo del pH de su medio. Para la separación electroforética de proteínas, se usa un amortiguador para impartir una carga a las proteínas séricas. El pH y la fuerza iónica del amortiguador son factores importantes que afectan la separación de proteínas. Los típicos amortiguadores usados incluyen barbital, tris barbital, y un amortiguador de borato compuesto de ácido bórico, tris y EDTA. Estos amortiguadores son usados ordinariamente a pH de 8.6, por lo que la mayoría de las proteínas del plasma adquieren una carga negativa. La concentración del amortiguador usualmente va desde 0.05 a 0.15 mol/L. Si la concentración del amortiguador es demasiado alta, la migración de las proteínas a través del medio de soporte se hace más lenta debido a que los iones del amortiguador compiten con las proteínas por la corriente.

Otro de los factores que afecta la separación de las proteínas es el fenómeno llamado electroendósmosis. La electroendósmosis describe el flujo del amortiguador hacia el cátodo como consecuencia de la carga superficial negativa presente en ciertos tipos de medios de soporte. La carga superficial negativa atrae una capa de iones disueltos cargados positivamente. Cuando la corriente es aplicada, una zona delgada de iones positivos móviles migrarán hacia el cátodo. Los iones que migran están asociados con el solvente del



amortiguador. Las proteínas que no poseen una relación carga-masa suficiente para vencer este flujo del solvente del amortiguador serán arrastradas hacia atrás de su punto de aplicación, esto es hacia el cátodo. La gama globulinas, que tienen un punto isoelectrico (pI) cercano al pH del amortiguador, es uno de los grupos de proteínas afectadas por la electroendósmosis.

Una vez separadas, las bandas de proteínas individuales son visualizadas por el uso de un colorante que tiñe las diferentes fracciones de proteínas. Los colorantes usados incluyen negro de amida, ponceau S, azul de bromofenol, y azul brillante de Coomassie. Los colorantes tienen diferentes afinidades para las diversas fracciones de proteínas y se comportan diferentemente con respecto al medio de soporte que ha sido usado para la separación de proteínas. El negro de amida es comúnmente usado para la tinción de los geles de agarosa; sin embargo, el colorante tiene una afinidad levemente mayor por albúmina y transferrina que por las fracciones de globulinas. El ponceau S funciona mejor con acetato de celulosa. Una desventaja del ponceau S es que tiñe la albúmina con mayor intensidad que a las globulinas. El azul de bromofenol es útil para teñir proteínas en un medio de soporte de agarosa. Sin embargo, al igual que el ponceau S da mayor color con albúmina que con las globulinas.[ref\(1990\)](#) El colorante azul de Coomassie tiene aproximadamente un orden magnitud mayor de sensibilidad analítica que los otros colorantes, haciéndolo apropiado para usarse después de la electroforesis de muestras tales como orina y LCR, las cuales usualmente tienen concentraciones de proteínas mucho menores que aquellas encontradas en el suero.[ref\(1991\)](#)

Las bandas de proteínas individuales pueden también ser detectadas inmunológicamente por el uso de antisuero específico. La ventaja de realizar inmunoelectroforesis o electroforesis de inmunofijación en conjunto con electroforesis de proteínas del suero (EPS) consiste en la identificación de inmunoglobulinas monoclonales anormales, las cuales no migran con las otras globulinas gama y pueden ser confundidas por otra proteína (es decir, fibrinógeno, hemoglobina o transferrina).

Los métodos comúnmente usados hoy en día para la separación electroforética de proteínas séricas incluyen electroforesis de zona, y electroforesis de alta resolución. La electroforesis de zona[refs\(1992\)](#) usa un medio de soporte inerte como el gel de agarosa.

El uso de la electroforesis de alta resolución (EAR) es preferible sobre la menos sensible electroforesis de zona.[ref\(1993\)](#) Esta técnica permite la separación de proteínas adicionales que no son usualmente detectadas por EPS. Tanto el gel de agarosa como el acetato de celulosa pueden ser usados como medios de soporte. Usando poliacrilamida como medio de soporte, se pueden observar por encima de 100 bandas de proteínas del suero.

Otras técnicas más elaboradas usadas para separar proteínas, que se utilizan principalmente en la investigación y en condiciones analíticas críticas, incluyen el enfoque isoelectrico (EIE) y electroforesis bidimensional. El EIE separa proteínas en base a sus puntos isoelectricos individuales. Se crea un gradiente de pH en el gel usando una mezcla de anfóteros, los cuales migran rápidamente a sus puntos isoelectricos individuales durante la electroforesis. Las proteínas migrarán en el gel hasta que alcancen una posición en el gel donde el pH del gel es el mismo que su pH isoelectrico. En su pH isoelectrico, o pI, las proteínas no tienen más carga y por lo detienen su migración. El EIE puede ser usado para detectar la presencia de paraproteínas en el suero[ref\(1994\)](#) y bandas oligoclonales en LCR.[ref\(1995\)](#) Esto también ha sido particularmente útil para distinguir la hemoglobina fetal de la hemoglobina glucosilada y para identificar los fenotipos de alfa₁-antitripsina.[ref\(1996\)](#)



La técnica más poderosa disponible hoy para la separación de proteínas es la electroforesis bidimensional. Este método separa proteínas primero por EIE en una dimensión y luego por peso molecular en una segunda dimensión. Más de 1000 proteínas pueden ser separadas e identificadas cuando se usa este método con análisis computarizado. El costo relativamente alto y las dificultades en interpretar los resultados de la electroforesis bidimensional limita su uso a circunstancias clínicas especiales.[refs\(1997\)](#)

Especimen

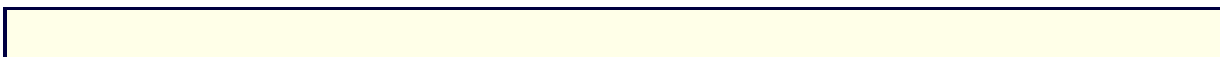
El suero es la muestra de elección para la electroforesis de proteínas. El plasma puede ser usado; sin embargo, el fibrinógeno presente en el plasma migrará entre las globulinas beta y el punto de aplicación dando lugar a una banda de proteína adicional. La proteína presente en orina y en el líquido cefalorraquídeo puede ser analizada si se aumenta la concentración de proteínas presentes en estas muestras. La ultracentrifugación y la diálisis son dos técnicas comunes usadas para concentrar proteínas en orina y LCR.

Intervalo de referencia

Los intervalos de referencia para cada una de las cinco fracciones de proteínas séricas comúnmente medidas deben establecerse individualmente por cada laboratorio que realiza electroforesis de proteínas séricas. Los múltiples colorantes que están disponibles para teñir las distintas fracciones de proteínas proporcionan diferentes intervalos de referencia ya que cada una de las fracciones de proteínas individuales se une a estos colorantes con afinidades diferentes. Los intervalos de referencia aproximados para las cinco fracciones de proteínas comúnmente medidas en suero están dadas en la Tabla 49-16.[ref\(1998\)](#)

Referencias

1. Sager R: Explorations on the origin of cancer, *Focus* 2/3:1-3, 1983.
2. Aaronson SA: Growth factors and cancer, *Science* 254:1146-1153, 1991.
3. Cantley LC, Auger KR, Carpenter C, et al: Oncogenes and signal transduction, *Cell* 64:281-302, 1991.
4. Niman HL: Detection of oncogene-related proteins with site-directed monoclonal antibody probes, *J Clin Lab Anal* 1:28-41, 1987.
5. Habbema JDF, van Oortmarssen GJ: Performance characteristics of screening tests. In Statland BE, Winkel P, editors: *Laboratory measurements in malignant disease*, vol 2, Philadelphia, 1982, Saunders.
6. EVAC: *Rapport eerste screeningsronde*, Leidschendam, 1980, Ministerie van Volksgezondheid en Milieuhygiene.
7. Tabar L, Gad A: Screening for breast cancer: the Swedish trial, *Radiology* 138:219-222, 1981.
8. Woolner LB, Fontant RS, Sanderson DR, et al: Mayo Lung Project: evaluation of lung cancer screening through December 1979, *Mayo Clin Proc* 56:544-555, 1981.
9. Shapiro S: Evidence on screening for breast cancer from a randomized trial, *Cancer* 39:2772-2782, 1977.
10. Statland BE: *Clinical decision levels for lab tests*, Oradell, N.J., 1983, Medical Economics Co.
11. Rubin P: *Clinical oncology for medical students and physicians*, ed 5, New York, 1978, American Cancer Society.
12. Winkel P, Bentzon MW, Statland BE, et al: Predicting recurrence in patients with breast cancer from cumulative laboratory results: a new technique for the application of time series analysis, *Clin Chem* 28:2057-2067, 1982.
13. Ravry M, Moertel CG, Schutt AJ, et al: Usefulness of serial serum carcinoembryonic antigen (CEA)



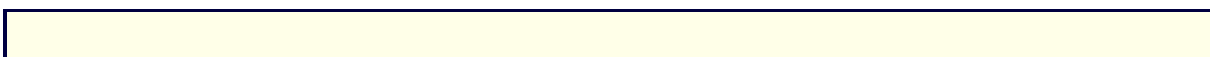
- determinations during anticancer therapy or long-term follow-up of gastrointestinal carcinoma, *Cancer* 34:1230-1234, 1974.
14. Chan DW: PSA as a marker for prostatic cancer, *Clin Chem* 33:1916-1920, 1987.
 15. Coombes RC, Neville AM: Significance of tumor-index substances in management. In Stoll BA, editor: *Secondary spread in breast cancer*, Chicago, 1978, William Heinemann Medical Books.
 16. Rej R, et al: Clinical laboratory testing in cancer patient diagnosis and management, *Clin Chem* 39:2359-2452, 1993.
 17. Sell S, editor: *Serological cancer markers*, Totowa, N.J., 1992, Humana Press.
 18. Gold P, Freedman SO: Demonstration of tumor-specific antigens in human colonic carcinomata by immunological tolerance and absorption techniques, *J Exp Med* 121:439-462, 1965.
 19. *CEA as a cancer marker*, vol 3, no 7, Bethesda, Md., 1981, National Institutes of Health, Consensus Development Conference Summary.
 20. Holyoke ED, Chu TM, Murphy GP: CEA as a monitor of gastrointestinal malignancy, *Cancer* 35:830-836, 1975.
 21. Costanza ME, Das S, Nathanson L, et al: Proceedings: carcinoembryonic antigen: report of a screening study, *Cancer* 33:583-590, 1974.
 22. McCartney WH, Hoffer PB: The value of carcinoembryonic antigen (CEA) as an adjunct to the radiological colon examination in the diagnosis of malignancy, *Radiology* 110:325-328, 1974.
 23. Wanebo HJ, Rao B, Pinsky CM, et al: Preoperative carcinoembryonic antigen level as a prognostic indicator in colorectal cancer, *N Engl J Med* 299:448-452, 1978.
 24. Statland BE, Winkel P: Usefulness of clinical chemistry measurements in classifying patients with breast cancer, *CRC Crit Rev Clin Lab Sci* 26:255-290, 1982.
 25. Sell S, Becker FF: Alpha-fetoprotein, *J Natl Cancer Inst* 60:19-26, 1978.
 26. Vaitukaitis JL: *Secretion of human chorionic gonadotrophin by tumors. In Carcino-embryonic proteins*, vol 1, New York, 1979, Elsevier/North Holland, pp 447-455.
 27. Braunstein GD: Human chorionic gonadotropin in nontrophoblastic tumors and tissues. In Talwar GP, editor: *Recent advances in reproduction and regulation of fertility*, Amsterdam, 1979, Elsevier/North Holland Biomedical Press.
 28. Anderson CK, Jones WG, Ward A: *Germ cell tumors*, London, 1981, Taylor and Francis.
 29. Carter HB, Pearson JD, Metter EJ, et al: Longitudinal evaluation of prostate specific antigen levels in men with and without prostate disease, *JAMA* 267:2215-2220, 1992.
 30. Schwartz MK: Enzyme tests in cancer. In Statland BE, Winkel P, editors: *Laboratory measurements in malignant disease*, Philadelphia, 1982, Saunders.
 31. Chu TM, Wang MC, Scott WW, et al: Immunological detection of serum prostatic acid phosphatase: methodology and clinical evaluation, *Invest Urol* 15:319-323, 1978.
 32. Watson RA, Tang DB: The predictive value of prostatic acid phosphatase as a screening test for prostatic cancer, *N Engl J Med* 303:497-499, 1980.
 33. Reddi K, Holland JF: Elevated serum ribonuclease in patients with pancreatic cancer, *Proc Natl Acad Sci* 73:2308, 1976.
 34. Fitzgerald PJ, Fortner JG, Watson RC, et al: The value of diagnostic aids in detecting pancreas cancer, *Cancer* 41:868- 879, 1979.
 35. Lake-Bakaar G, McKavanaugh S, Summerfield JA: Urinary immunoreactive trypsin excretion: a non-invasive screening test for pancreatic cancer, *Lancet* 2:878-880, 1979.
 36. Pertschuk LP, Eisenberg KB, Carter AC, Feldmann JG: Immunohistologic localization of estrogen receptors in breast cancer with monoclonal antibodies, *Cancer* 55:1513-1520, 1985.
 37. Robinson DB, Glew RH: Acid phosphatase in Gaucher's disease, *Clin Chem* 26:371-382, 1980.
 38. Yam LT, Li CY, Finkel HE: Leukemic reticuloendotheliosis: the role of tartrate-resistant acid phosphatase in the diagnosis and splenectomy in treatment, *Arch Intern Med* 130:248-256, 1972.
 39. Deftos LJ, Glowacki J: Mechanisms of bone metabolism. In Kem DC, Frohlich E, editors:



- Pathophysiology*, ed 3, Philadelphia, 1984, Lippincott.
40. Lau KH, Onishi T, Wergedal JE, et al: Characterization and assay of tartrate-resistant acid phosphatase activity in serum: potential use to assess bone resorption, *Clin Chem* 33:458-462, 1987.
 41. Teshima S, Hayashi Y, Ando M: Determination of acid phosphatase in biological fluids using a new substrate, 2,6-dichloro-4-nitrophenyl phosphate, *Clin Chim Acta* 168:231-238, 1987.
 42. Gavella M: Simple, rapid determination of zinc and acid phosphatase in seminal plasma with an ABA-100 bichromatic analyzer, *Clin Chem* 34:1605-1607, 1988.
 43. Ewen LM: Acid phosphatase activity (thymolphthalein monophosphate substrate). In Faulkner WH, Meites S, editors: *Selected methods for the small clinical laboratory*, Philadelphia, 1982, Saunders.
 44. Townsend RM: Enzyme tests in diseases of the prostate, *Ann Clin Lab Sci* 7:254-261, 1977.
 45. Young DS: *Effects of drugs on clinical laboratory tests*, Washington, D.C., 1990, American Association for Clinical Chemistry Press, pp 3-4 and 3-5.
 46. Schiele F, Artur Y, Floch AY, Siest G: Total, tartrate-resistant, and tartrate-inhibited acid phosphatase in serum: biological variations and reference limits, *Clin Chem* 34:685-690, 1988.
 47. Berggard I, Bearn AG: Isolation and properties of a low molecular weight β_2 -globulin occurring in human biological fluids, *J Biol Chem* 243:4095-4103, 1968.
 48. Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, et al: Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2, *Nature* 329:506-512, 1987.
 49. Plesner T, Bjerrum OJ: Distribution of "free" and HLA-associated human β_2 -microglobulin in some plasma membranes and biological fluids, *Scand J Immunol* 11:341-351, 1980.
 50. Nilsson K, Ervin P-E, Welsh KI: Production of β_2 -microglobulin by normal and malignant human cell lines and peripheral lymphocytes [Review], *Transplant Rev* 21:53-84, 1974.
 51. Fuchs D, Hausen A, Reibnegger G, et al: β_2 -Microglobulin and immune activation [Letter], *Clin Chem* 35:2158-2159, 1989.
 52. Bhalla RB, Safai B, Pahwa S, Schwartz MK: β_2 -Microglobulin as a prognostic marker for development of AIDS, *Clin Chem* 31:1411-1412, 1985.
 53. Wibell L, Ervin PE, Berggard I: Serum beta-2-microglobulin in renal disease, *Nephron* 10:320-331, 1973.
 54. Durie BGM, Stock-Novack D, Salmon SE, et al: Prognostic value of pretreatment serum β_2 microglobulin in myeloma: a Southwest Oncology Group study, *Blood* 75:823-830, 1990.
 55. Tienhaara A, Eskola JU, Nanto: Double monoclonal time-resolved immunofluorometric assay of β_2 -microglobulin in serum, *Clin Chem* 36:1961-1964, 1990.
 56. Peterson PA, Ervin PE, Berggard I: Differentiation of glomerular, tubular, and normal proteinuria: determinations of urinary excretion of β_2 -microglobulin, albumin, and total protein, *J Clin Invest* 48:1189-1198, 1969.
 57. Rifai N, Morales A: Immunoturbidimetry of β_2 -microglobulin in serum, *Clin Chem* 35:1996-1997, 1989.
 58. Desjarlais F, Daigneault R: Limitations of conventional laser nephelometry for the measurement of β_2 -microglobulin, lysozyme, α_1 -fetoprotein and myoglobin in serum and urine, *Clin Biochem* 14:146-149, 1981.
 59. Viedma JA, Pacheco S, Albaladejo MD: Determination of β_2 -microglobulin in serum by a microparticle-enhanced nephelometric immunoassay, *Clin Chem* 38:2464-2468, 1992.
 60. Ervin PE, Peterson PA, Wide L, Berggard I: Radioimmunoassay of β_2 -microglobulin in human biological fluids, *Scand J Clin Lab Invest* 28:439-443, 1971.
 61. Shuster J, Gold P, Poulik MO: β_2 M levels in cancerous and other disease states, *Clin Chim Acta* 67:307-313, 1976.
 62. Meillet D, Belec L, Schuller E, Delattre J: Time-resolved fluoroimmunoassay of β_2 -microglobulin in serum and cerebrospinal fluid, *Clin Chem* 39:552-553, 1993.
 63. Bjerrum OW, Birgens HS: Measurement of beta-2-microglobulin in serum and plasma by an



- enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), *Clin Chim Acta* 155:69-76, 1986.
64. Swanson RA, Tracy RP, Katzman JA, et al: β_2 -microglobulin determined by radioimmunoassay with monoclonal antibody, *Clin Chem* 28:2033-2039, 1982.
 65. Bastable MD: β_2 -microglobulin in urine: not suitable for assessing renal tubular function, *Clin Chem* 29:996-997, 1983.
 66. Forman DT: Serum beta-2-microglobulin as an indicator of neoplasia, *J Clin Immunoassay* 6:228-233, 1983.
 67. Lutz CT, Cornell SH, Goeken JA: Establishment of reference interval for β_2 -microglobulin in cerebrospinal fluid with use of two commercial assays, *Clin Chem* 37:104-107, 1991.
 68. Forman DT, Finn W, Mandel S: Comparison of an enzyme immunoassay for serum beta-2-microglobulin (β_2 M) with a radioimmunoassay technique, *Clin Chem* 29:1245, 1983.
 69. Turpeinen U, Haglund C, Roberts P, Stenman U-H: Comparability of three assays for carcinoembryonic antigen, *Clin Chem* 38(8):1506, 1992.
 70. Hammarstrom S, Shively JE, Paxton RJ, et al: Antigenic sites is carcinoembryonic antigen, *Cancer Res* 49:4852-4858, 1989.
 71. Bormer O: Standardization, specificity, and diagnostic sensitivity of four immunoassays for carcinoembryonic antigen, *Clin Chem* 37(2):231-236, 1991.
 72. Hansen H, Snyder J, Miller E, et al: Carcinoembryonic antigen (CEA) assay: a laboratory adjunct in the diagnosis and management of cancer, *Hum Pathol* 5:139, 1974.
 73. Rule A: Carcinoembryonic antigens (CEA). In Kaplan LA, Pesce AJ, editors: *Clinical chemistry theory: analysis and correlation*, Philadelphia, 1989, Mosby.
 74. Finley PR, Williams RJ, Licht DA, et al: Immunochemical determination of human immunoglobulins: use of kinetic turbidimetry and a 36-place centrifugal analyzer, *Clin Chem* 25:526-530, 1979.
 75. Papsidero L, Kuriyama M, Wang M, et al: Prostate antigen: a marker for human prostatic epithelial cells, *J Natl Cancer Inst* 66:37-41, 1981.
 76. Iwakiri J, Grandbois K, Graves HCB, Stamey T: An analysis of urinary prostate-specific antigen before and after radical prostatectomy: evidence for secretion of prostate-specific antigen by the periurethral glands, *J Urol* 149:783-786, 1993.
 77. Vessella KL: Trends in immunoassays of prostate-specific antigen: serum complexes and ultrasensitivity, *Clin Chem* 39(10):2035-2039, 1993.
 78. Lange PH, Ercole CJ, Lightner DJ, et al: The value of serum prostate-specific antigen determinations before and after radical prostatectomy, *J Urol* 141:873-879, 1989.
 79. Oesterling JE: Prostate specific antigen: a critical assessment of the most useful tumor marker for adenocarcinoma of the prostate, *J Urol* 145:907-923, 1991.
 80. Armbruster DA: Prostate-specific antigen: biochemistry, analytical methods, and clinical application, *Clin Chem* 39(2):181-195, 1993.
 81. White RW, Meyers FJ, Soares SE, et al: Urinary prostate specific antigen levels: role in monitoring the response of prostate cancer to therapy, *J Urol* 147:947-951, 1992.
 82. Brawer MK: Laboratory studies for the detection of carcinoma of the prostate, *Urol Clin North Am* 17:759-768, 1990.
 83. Killian CS, Chu TM: Prostate-specific antigen: questions often asked, *Cancer Invest* 8:27-37, 1990.
 84. Simm B, Gleeson M: Storage conditions for serum for estimating prostate-specific antigen, *Clin Chem* 37:113-114, 1991.
 85. van Dieijen-Visser MP, Delaere KPJ, Gijzen AHJ, Brombacher PJ: A comparative study on the diagnostic value of prostatic acid phosphatase (PAP) and prostatic-specific antigen (PSA) in patients with carcinoma of the prostate gland, *Clin Chem Acta* 174:131-140, 1988.
 86. Babaian R, Camps J: The role of prostate-specific antigen as part of the diagnostic triad and as a guide when to perform a biopsy, *Cancer* 68:2060-2063, 1991.
 87. Fritsche HA, Babaian RJ: Analytical performance goals for measuring prostate-specific antigen, *Clin* 2039



Chem 39(7):1525-1529, 1993.

88. Rosenfield L: Serum protein electrophoresis: a comparison of the use of thin-layer agarose gel and cellulose acetate, *Am J Clin Pathol* 62:702-706, 1974.

89. Jeppsson JO, Laurell CB, Franzen B: Agarose gel electrophoresis, *Clin Chem* 25:629-638, 1979.

90. Ojala K, Weber TH: Some alternatives to the proposed selected method for "agar gel electrophoresis," *Clin Chem* 26:1754-1755, 1980.

91. Harrison HH, Levitt MH, Bedford K: *Serum protein electrophoresis: basic principles, interpretations, practical considerations, and new techniques*. ASCP Check Sample Core Analyte No. PTS93-8 (PTS-74), Chicago, American Society of Clinical Pathologists, pp 1-10.

92. Whicher JT, Spence CE: Serum protein zone electrophoresis-an outmoded test? *Ann Clin Biochem* 24:133-139, 1987.

93. Sinclair D, Kumeraratne DS, Forrester JB, et al: The application of isoelectric focusing to routine screening for paraproteins, *J Immunol Methods* 64:147-156, 1983.

94. Roos RP, Lichter M: Silver staining of cerebrospinal fluid IgG in isoelectric focusing gels, *J Neurosci Methods* 8:375-380, 1983.

95. Harrison HH, Miller KL, Dickinson C, Daufeldt JA: Quality assurance and reproducibility of high-resolution two-dimensional electrophoresis and silver staining in polyacrylamide gels, *Am J Clin Pathol* 97:97-105, 1992.

96. Janson RW, Verstosick FT Jr, Kelly RH: A method for recovery of active, clonally-restricted immunoglobulins from agarose gels, *Electrophoresis* 10:11-15, 1989.

Tablas

Tabla 49-1. Estimación de casos nuevos de cáncer y muertes en 1995 en los Estados Unidos por ubicación y sexo. [ref\(1999\)](#)

Ubicación	<u>Sexo</u>	
	Hombres (%)	Mujeres (%)
Mama	-	32
Colon y recto	10	12
Tejido sanguíneo y linfático (leucemia y linfomas)	8	7
Pulmón	14	13
Cavidad oral	3	2
Ovario	-	5
Páncreas	2	2
Glándula prostática	36	-
Piel	3	3
Tracto urinario	8	4
Útero	-	8
Otros	16	13

Tabla 49-2. Clases de oncogenes y sus productos proteicos derivados.

Clase de factor	Factor	Producto del gen
Factores de crecimiento	<i>sis</i>	PDGF B, cadena del factor de crecimiento
Proteína tirosina cinasa	<i>sic</i>	Asociado a membrana, receptor de proteína tirosina cinasa
Receptores sin actividad proteína cinasa	<i>mas</i>	Receptor de angiotensina
Proteínas G asociadas a la membrana	<i>H-ras</i>	Asociado a membrana GTP-unido/GTPasa
Proteína cinasa citoplasmática	<i>rat/mil</i>	Proteína cinasa
Reguladores citoplasmáticos	<i>crk</i>	Proteína SH-23
Cofactores de la transcripción nuclear	<i>myc</i>	Secuencia específica, proteína unida al DNA

Tabla 49-3. Puebas de tamizaje para la detección temprana del cáncer.

Sitio	Prueba
Cavidad oral	Examen visual
Colon y recto	Prueba de heces para sangrado oculto, sigmoidoscopia
Cuello de útero	Frotis papanicolau, examen pélvica
Enfermedad de Hodgkin	Examen físico y roentgenografía
Estómago	Fotofluorografía, lavado salino y examen citológica del contenido gástrico, examen de heces por sangrado oculto
Mama	Mamografía, exáminación física, autoexamen
Piel	Inspección visual
Próstata	Palpitación digital por recto, masaje prostático y examen citológica
Pulmón	Rayos-X, análisis citológico de sputum
Vejiga	Análisis citológico de orina
De: Habbema JDF, van Oortmarssen GJ, van der Maas, PJ. En Statland BE, Winkel P, editores: <i>Laboratory measurements in malignant disease</i> , vol 2, Philadelphia, 1982,	



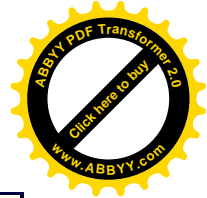
Saunders.

Tabla 49-4. Clases de parámetros bioquímicos usados como marcadores tumorales.

Clase de bioquímico	Ejemplos	Uso
Producción aumentada de bioquímicos endógenos	Hormonas, enzimas, poliaminas, y ect.	Confirmación, diagnóstico, monitoreo
Síntesis de bioquímicos de genes apagados anteriormente	Proteínas oncofetales, antígeno de superficie celular, enzimas	Monitoreo, pronóstico
Receptores	Receptor de estriol (cáncer de mama), receptor de andrógeno (cáncer de próstata)	Pronóstico, tratamiento
Modificación de la función normal de la célula o del órgano	Gama-glutamyltrans-ferasa (GGT) o 5'-nucleotidasa	Diagnóstico

Tabla 49-5. Clasificación la OMS de tumores de células embrionarias y marcadores tumorales asociados.

Clasificación WHO	Inmunohistoquímica		Serología		Comentarios
	AFP	GCH	AFP	GCH	
Seminoma (S)	–	+	No	±Si	GCH en células gigantes
Carcinoma embrionario (EC)	+	+	±Si	±Si	GCH en células gigantes AFP discutido, puede ocurrir en elementos del saco vitelino no diagnosticados
Tumor del saco + vitelino (YST)		–	±Si	No	
Coriocarcinoma– (CC)		+	No		



Teratoma (TT) –	–	No?	No?
De: Norgaard-Pedersen, Hangaard J: En Statland BE, Winkel P, editores: <i>Laboratory measurements in malignant disease</i> , Philadelphia, 1982, Saunders. <i>AFP</i> , alfa-fetoproteína; <i>GCH</i> , gonadotropina coriónica humana.			

Tabla 49-6. Sensibilidades de diagnóstico (por ciento positivo) de varios ensayos de FAP para el carcinoma prostático.*

Estadio Químico†		Radioinmunoensayo			
		†	‡	§	
A	12	33	13	0	8
B	15	79	26	20	21
C	29	71	30	33	40
D	60	92	94	79	86
* Las sensibilidades fueron calculadas de datos presentados en la referencia listada para cada ensayo.					
† Foti AG, Cooper JF, Herschman H, et al: <i>N Engl J Med</i> 297: 1357-1361, 1977.					
‡ Mahan DE, Doctor BP: <i>Clin Biochem</i> 12:10-17, 1979.					
§ Chu TM, Wang MC, Scott WW, et al: <i>Invest Urol</i> 15: 319-323, 1978.					
New England Nuclear, April 1979, Study Report, Boston.					

Tabla 49-7. Metástasis de hígado y actividad enzimática del suero en 95 pacientes.

Enzima:	Fosfatasa alcalina (FAL)
Pacientes con metástasis	
Normal:	9
Anormal:	31
Pacientes sin metástasis	
Normal:	36
Anormal:	18
Número de pacientes:*	94
Enzima:	5'Nucleotidasa (5'NT)
Pacientes con metástasis	
Normal:	13
Anormal:	24
Pacientes sin metástasis	
Normal:	50
Anormal:	4

Número de pacientes:*	91
Enzima:	Gama-glutamyltransferasa (GGT)
Pacientes con metástasis	
Normal:	1
Anormal:	35
Pacientes sin metástasis	
Normal:	30
Anormal:	25
Número de pacientes:*	91
Enzima:	Glutamato deshidrogenasa (GD)
Pacientes con metástasis	
Normal:	11
Anormal:	26
Pacientes sin metástasis	
Normal:	36
Anormal:	19
Número de pacientes:*	92
De: Kim NK, Yamineh WG, Freier EF, et al: <i>Clin Chem</i> 23: 2034-2038, 1977.	
* El total es menor que 95 porque algunas determinaciones enzimáticas fueron omitidas.	

Tabla 49-8. Heterogeneidad fenotípica de ALL.

ALL	E	HTA	SmIg	Cyμ	CALLA	HLA-DR	Td T
ALL común	–	–	–	–	+	+	+
Pre-B-ALL	–	–	–	+	+	+	+
Null-ALL	–	–	–	–	–	+	+
T-ALL	+	+	–	–	–	–	+
B-ALL	–	–	+	–	–	+	–
De: Plesner T, Wilken M Avenstrøm S: In Statland BE, Winkel P, editors: <i>Laboratory measurements in malignant disease</i> , Philadelphia, 1982, Saunders. <i>ALL</i> , Leucemia linfocítica aguda; <i>B-ALL</i> , leucemia linfoblástica aguda del tipo de las células B; <i>CALLA</i> , antígeno común de <i>ALL</i> ; <i>Cyμ</i> , cadena pesada de IgM citoplásmica; <i>E</i> , receptor de eritrocitos ovinos; <i>HLA-DR</i> , antígeno humano tipo Ia; <i>HTA</i> , antígeno(s) de tirocito humano; <i>SmIg</i> , inmunoglobulina de la membrana de superficie; <i>T-ALL</i> , leucemia linfoblástica aguda del tipo de las células B; <i>TdT</i> , desoxinucleotidil transferasa terminal							



Tabla 49-9. Métodos de medida de la ácido fosfatasa total y prostática (FAP).

Método:	1
Tipo de análisis:	Espectrofotometría punto-final
Principio:	Fenol liberado desde el sustrato fosfato es medido con el reactivo Folin-Ciocalteu
Uso:	Suero Manual
Comentarios:	Únicamente interés histórico
Método:	2
Tipo de análisis:	Espectrofotometría cinética
Principio:	Timolftaleína liberada desde el sustrato monofosfato detimolftaleína es medido colorimétricamente después del agregado de base
Uso:	Comúnmente usado Todos los fluidos corporales y Manual o automático
Comentarios:	Alta especificidad para FAP sensible, sustrato de indicación propia
Método:	3
Tipo de análisis:	Espectrofotometría punto-final o cinética
Principio:	α -naftol liberado desde fosfato de α -naftol reacciona con Fast Red TR para formar un producto coloreado
Uso:	Comúnmente usado Suero Manual o automático
Comentarios:	No específico para FAP
Método:	4
Tipo de análisis:	Cinética fluorométrica
Principio:	Velocidad de aparición de fosfato 4-metilumbeliferona fluorescente liberado del fosfato 4-metilumbeliferona es medida por ACP
Uso:	Todos los fluidos Manual o automático Usado poco frecuentemente
Comentarios:	Sustrato sensible, requiere instrumento especializado
Método:	5
Tipo de análisis:	Radioinmunoensayo
Principio:	Anticuerpo es dirigido contra FAP cubierto en un soporte sólido.
Uso:	Todos los fluidos corporales Usado poco frecuentemente
Comentarios:	Específico para FAP
Método:	6



Tipo de análisis: Ensayo inmunométrico enzimático	
Principio:	Anticuerpo monoclonal ligado al soporte sólido se une a FAP. Anticuerpo secundario conjugado a enzima (FAL o peroxidasa) se une a FAP ligada; la cantidad de actividad enzimática unida es proporcional a las concentraciones de FAP
Uso:	Usado frecuentemente Automático, tiempo de análisis rápido
Comentarios:	Específico para FAP

Tabla 49-10 Métodos para medición de beta₂-microglobulina (β₂-M) en suero y orina.

Método:	1. Inmunodifusión radial simple (IRS)
Tipo de análisis:	Cuantitativo
Principio:	La difusión de proteínas es a través de un medio conteniendo anticuerpo específico
Uso:	Suero, orina Manual
Rango de concentración útil (mg/L):	5-75
Comentarios:	Requiere preconcentración de muestra, muy largo tiempo de incubación
Método:	2. Inmunoensayo látex
Tipo de análisis:	Cuantitativo
Principio:	La aglutinación directa es por partículas de latex de β ₂ M en las cuales β ₂ es absorbida
Uso:	Suero, orina Automático
Rango de concentración útil (mg/L):	0.25-16
Comentarios:	Requiere contador de partículas o turbidímetro
Método:	3. Procedimientos de radioinmunoensayo (RIA), fase sólida, anticuerpo doble, y anticuerpo monoclonal
Tipo de análisis:	Cuantitativo
Principio:	Ver texto
Uso:	Suero, orina Semiautomático
Rango de concentración útil (mg/L):	0.15-20.0
Comentarios:	Precisión y sensibilidad adecuada, puede



ser completado con un día de trabajo	
Método:	4. Fluoroinmunoensayo (FIA), fase sólida
Tipo de análisis:	Cuantitativo
Principio:	La disociación del ion europio fluorescente de la β_2 M marcada, la cual compite con la β_2 M en muestra por unirse a anticuerpos monoclonales anti- β_2 M
Uso:	Suero, LCR Automático Disponible comercialmente
Rango de concentración útil (mg/L):	0.2-32
Comentarios:	Requiere volumen de muestra exacto y preciso, larga vida en anaquel, marcador de europio disponible no radioactivo
Método:	5. Inmunoensayo enzimático (EIE), fase sólida
Tipo de análisis:	Cuantitativo
Principio:	En el inmunoensayo enzimático competitivo, la β_2 M compite con una cantidad fijada de enzima marcada β_2 M por los sitios de unión en el anti- β_2 M. La enzima unida es medida por hidrólisis de sustrato específico. La absorbancia producida es inversamente proporcional a la concentración de β_2 M
Uso:	Suero, orina Semiautomático Disponible comercialmente para uso clínico
Rango de concentración útil (mg/L):	0.2-10.5 Reproducible y sensible, se correlaciona con RIA, reactivos estables.
Comentarios:	Es conveniente la incubación y los pasos de separación; el ensayo puede ser completado en 4 horas LCR, Líquido cefalorraquídeo

Tabla 49-11. Métodos de análisis de CEA.

Método:	1. Radioinmunoensayo (RIA)
Principio:	El plasma debe ser extraído (ensayo indirecto) con ácido o calor para remover proteínas, o el plasma debe ser usado sin realizar previo un paso de extracción (ensayo directo). El plasma reacciona con el anticuerpo por 30 minutos a 45° C seguido por la adición de 125 I-CEA por 30 minutos

Uso:	a 45°C. Plasma o suero Uso decayendo
Comentario:	Paso de extracción seguido por un aumento de la sensibilidad del ensayo. El ensayo directo es usado para monitorear pacientes con CEA ≥ 20 ng/mL.
Método:	2. Inmunoensayo enzimático (EIE)
Principio:	El inmunoensayo tipo “sandwich” utiliza anticuerpo anti-CEA unido a fase sólida seguido de la adición de un segundo anticuerpo con enzima marcada. La adición del sustrato de la enzima resulta en la formación de un producto que puede ser detectado espectrofotométricamente
Uso:	Plasma o suero Método en uso mas común

Tabla 49-12. Métodos de inmunoelectroforesis.

Método:	1. Inmunoelectroforesis (IEF)
Principio:	Las proteínas son separadas primero en agarosa por electroforesis de zona. Luego el antisuero es colocado en un canal horizontal para separar proteínas. Las bandas precipitadas aparecen en áreas donde se encuentran los antígenos y anticuerpos
Uso:	Suero, orina, otros fluidos corporales
Comentarios:	Usado como prueba confirmatoria para identificación de proteínas monoclonales
Método:	2. Inmunofijación
Principio:	Las proteínas son separadas por electroforesis de zona seguido por la aplicación de antisuero monoespecífico al área conteniendo proteínas para ser identificadas
Uso:	Suero, orina, otros fluidos corporales
Comentarios:	Más sensible que IEF para la identificación de proteínas monoclonales

Table 49-13.

Método	Principio	Uso	Comentarios
1. Inmunmo-	Las proteínas son	Suero, orina,	Usado como prueba



electroforesis (IEF)	separadas primeros en agarosa por electroforesis de zona. Luego el antisuero es colocado en un canal horizontal para separar proteínas. Las bandas precipitadas aparecen en áreas donde se encuentran los antígenos y anticuerpos	otros fluidos corporales	confirmatoria para identificación de proteínas monoclonales
2. Inmunofijación	Las proteínas son separadas por electroforesis de zona seguido por la aplicación de antisuero monoespecífico al área conteniendo proteínas para ser identificadas	Suero, orina, otros fluidos corporales	Mas sensible que IEF para la identificación de proteínas monoclonales

Tabla 49-13. Métodos para cuantificación de inmunoglobulinas.

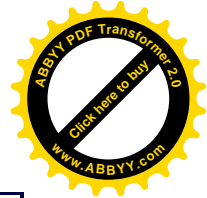
Método:	1. Inmunodifusión radial (IRS)
Principio:	La inmunoglobulina difunde en el gel conteniendo anticuerpo resultando en la formación de inmunoprecipitado. El diámetro del anillo de precipitación es proporcional a la concentración de inmunoglobulina.
Uso:	Suero, LCR, otros fluidos corporales Usado frecuentemente
Comentarios:	Lento y laborioso Exacto
Método:	2. Nefelometría
Principio:	La reacción de la inmunoglobulina con el anticuerpo resulta en la formación de inmunoprecipitado, el cual dispersa la luz. La cantidad de luz dispersada es proporcional a la concentración de inmunoglobulina.
Uso:	Suero, LCR, otros fluidos corporales Usado mas comúnmente
Comentarios:	Automático Requiere instrumentación especializada Exacto
Método:	3. Turbidimetría
Principio:	La reacción de inmunoglobulina con el



Uso:	anticuerpo resulta en la formación de inmunoprecipitado, el cual aumenta la turbidez de la muestra y dispersa la luz Suero Usado comúnmente
Comentarios:	Automático Requiere instrumentación especializada
LCR, líquido cefalorraquídeo	

Tabla 49-14. Propiedades físicas de las inmunoglobulinas humanas.

Clase de inmunoglobulina:	Peso molecular (daltones)
IgG:	150,000
IgM:	900,000
IgA:	160,000 (monómero) 320,000 (dímero)
IgD:	185,000
IgE:	200,000
Clase de inmunoglobulina:	Coefficiente de sedimentación, S
IgG:	6.6
IgM:	18.0-19.0
IgA:	6.25-10.9
IgD:	6.2-7.0
IgE:	7.86-7.92
Clase de inmunoglobulina:	Cadenas pesadas
IgG:	γ
IgM:	μ
IgA:	α
IgD:	δ
IgE:	ϵ
Clase de inmunoglobulina:	Subclases de cadenas pesadas
IgG:	$\gamma_1, \gamma_2, \gamma_3, \gamma_4$
IgM:	μ_1, μ_2
IgA:	α_1, α_2
IgD:	—
IgE:	—
Clase de inmunoglobulina:	Cadenas livianas
IgG:	κ o λ
IgM:	κ o λ



IgA:	κ o λ
IgD:	κ o λ
IgE:	κ o λ
Clase de inmunoglobulina:	Fórmula molecular
IgG:	$\text{IgG}(\kappa)2\gamma2\kappa$ $\text{IgG}(\lambda)2\gamma2\gamma$
IgM:	$\text{IgM}(\kappa)(2\mu2\kappa)_s$ $\text{IgM}(\gamma)(2\mu2\lambda)_s$
IgA:	$\text{IgA}(\kappa)(2\alpha2\kappa)_{1-3}$ $\text{IgA}(\lambda)(2\alpha2\lambda)_{1-3}$
IgD:	$\text{IgD}(\kappa)2\delta2\kappa$ $\text{IgD}(\lambda)2\delta2\lambda$
IgE:	$\text{IgE}(\kappa)2\epsilon2\kappa$ $\text{IgE}(\lambda)2\epsilon2\lambda$
Intervalo de referencia de las concentraciones del suero (mg/mL) (por edad)	
Clase de inmunoglobulina:	Especimen cord
IgG:	7.66-16.93
IgM:	0.04-0.26
IgA:	0.0004-0.09
Clase de inmunoglobulina:	0.5-3 meses
IgG:	2.99-8.52
IgM:	0.15-1.49
IgA:	0.03-0.66
Clase de inmunoglobulina:	3-6 meses
IgG:	1.42-9.88
IgM:	0.18-1.18
IgA:	0.04-0.90
Clase de inmunoglobulina:	6-12 meses
IgG:	4.18-11.42
IgM:	0.43-2.23
IgA:	0.014-0.95
Clase de inmunoglobulina:	1-2 años
IgG:	3.56-12.0
IgM:	40.37-2.39
IgA:	0.13-1.18
IgE:	116-122ng/mL
Clase de inmunoglobulina:	2-3 años



IgG:	4.92-12.69
IgM:	0.49-2.04
IgA:	0.23-1.37
IgE:	80-122 ng/mL
Clase de inmunoglobulina:	3-6 años
IgG:	5.64-13.81
IgM:	0.51-2.14
IgA:	0.35-2.09
Clase de inmunoglobulina:	4-7 años
IgE:	140-442 ng/mL
Clase de inmunoglobulina:	6-9 años
IgG:	6.58-415.35
IgM:	0.50-2.28
IgA:	0.29-3.84
Clase de inmunoglobulina:	10-14 años
IgE:	374-674 ng/mL
Clase de inmunoglobulina:	12-16 años
IgG:	6.80-15.48
IgM:	0.45-2.56
IgA:	0.81-2.52
Clase de inmunoglobulina:	Adulto
IgG:	8.00-16.00
IgM:	0.50-2.00
IgA:	1.40-3.50
IgD:	0-0.14
IgE:	2-2000 ng/mL
Datos de Seligson O, editor: <i>Handbook series in clinical laboratory science</i> . Sección F. <i>Immunology</i> , vol 1, part 1, Boca Raton, Fla., 1978, CRC Press; y Meites S, editor: <i>Pediatric clinical chemistry</i> , ed 2, Chicago, 1981, American Association for Clinical Chemistry.	

Tabla 49-15. Métodos para análisis de AEP.

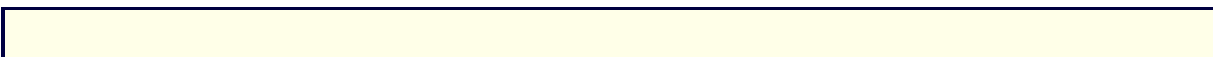
Métodos	Principio	Uso	Comentarios
1. Radioinmuno-ensayo (RIA)	Unión competitiva entre AEP y ¹²⁵ I-AEP para	Uso en descenso	Requiere paso separación



				sitios de unión de anticuerpo de separación
2. Enayo inmunoradiométrico (EIRM)	AEP en muestra de paciente unida a anticuerpo unido a fase sólida. Segundo anticuerpo marcado con ^{125}I unido a fase sólida del complejo anticuerpo-AEP para formar un sandwich	Uso en descenso	Requiere separación	
3. Inmunoensayo enzimático basado en micropartícula (IAEM)	AEP en muestra unida a anticuerpo-complejo micropartícula, el cual es luego atrapado en una matriz de fibra de vidrio. Segundo anticuerpo marcado con FAL es agregado, y éste se une al AEP en micropartículas. Es agregado el sustrato conteniendo 4-metilumbelliferil fosfato, y es medida la fluorescencia del producto 4-metilumbeliferona.	Usado mas frecuentemente	Automático Buena sensibilidad	
4. Inmunoensayo enzimático (EIE)	Similar al método 2 descrito arriba excepto el marcador usado es FAL en lugar ^{125}I . La absorbancia del <i>p</i> -nitrofenol formado de la reacción de FAL y <i>p</i> -nitrofenil fosfato está directamente relacionado a la concentración de AEP en muestra de pacientes	Usado frecuentemente	Automático	

Tabla 49-16. Intervalos de referencia aproximados para fracciones de proteínas séricas.

Total	Albúmina	Alfa ₁	Alfa ₂	Beta	Gama
Cantidad (%)	50	5	10	15	20
Intervalo, g/dL*	3.2-5.5	0.1-0.3	0.6-1.0	0.7-1.1	0.8-1.6
*Si uno asume un intervalo de referencia de proteína total usual de 6.0 a 8.3 g/dL					



CAPÍTULO 50

50. Evaluación de Laboratorio del Receptor y del Donante de Trasplante

Timothy J. Schroeder

Stephen J. Rossi

Kevin T. Schlueter

M. Roy First

Evaluación de pretrasplantes

Donante vivo (riñón)

Donante cadáver

Riñón

Hígado

Páncreas

Corazón

Receptor

Renal

Otros receptores

Diagnóstico clínico y patológico del rechazo de trasplantes

Riñón

Hígado

Corazón

Páncreas

Monitoreo de laboratorio del receptor de trasplante

Riñón

Páncreas

Hígado

Pruebas estáticas

Pruebas dinámicas

Corazón

Monitoreo farmacológico

Corticosteroides

Azatioprina y ciclofosfamida

Ciclosporina A

Farmacocinética

Efectos adversos

Interacciones de fármacos

Monitoreo



Tacrolimus

Preparaciones antilinfocíticas policlonales

OKT3

Monitoreo inmunológico

Pruebas de antígenos de leucocitos humanos

Batería de prueba de anticuerpos reactivos

Compatibilidad cruzada de linfocitos

Cultivos mixtos de linfocitos

Monitoreo del receptor soluble de interleuquina-2

Conclusión

OBJETIVOS

- Delinear las pruebas de laboratorio realizadas antes del trasplante en los donantes renales potenciales vivos con parentesco y en cadáveres, donantes de hígado, donantes del corazón y donantes de páncreas así como los receptores de trasplante potenciales.
- Definir los diferentes tipos de rechazo que ocurren en los pacientes de trasplante con respecto al tiempo en que se realiza el proceso, desempeño del órgano y diagnóstico.
- Enumerar los componentes más importantes de la evaluación de laboratorio en los siguiente tipos de trasplante:
 - Riñón
 - Páncreas
 - Hígado
 - Corazón
- Enumerar los agentes inmunosupresores que se evalúan mediante el monitoreo de medicamentos terapéuticos.
- Definir los ensayos inmunológicos de pretrasplante utilizados para predecir la compatibilidad de un donante con un receptor potencial.

Términos clave

alogénico Se refiere a los órganos o células de otra persona, que pueden o no tener los mismos antígenos de histocompatibilidad que el receptor.

anticuerpo Clase de proteínas séricas inducidas después del contacto con un antígeno. Un anticuerpo se une específicamente al antígeno que indujo su formación. La mayoría de los anticuerpos están presentes en la fracción de gama globulinas de suero.

antígeno Cualquier molécula que puede ser reconocido por el sistema inmune. En general, las inmunoglobulinas reconocen y se unen a los antígenos intactos.

antígeno de leucocitos humanos Es el principal complejo de histocompatibilidad. Está dividido en siete grupos principales: A, B, C, Clase III, DR., DQ y DP. Se le conoce ampliamente bajo su abreviatura inglesa HLA, por "Human Leukocyte Antigen").

azatioprina y 6-mercaptopurina Análogos de purinas que actúan sobre los linfocitos pequeños y células en división, de ese modo bloquean el desarrollo de linfocitos T responsables del rechazo de órganos.



células B Linfocitos que se desarrollan en el hígado fetal y posteriormente en la médula ósea. Responden a estímulos antigénicos mediante la división y diferenciación en células plasmáticas bajo el control de citoquinas generadas por los linfocitos T.

marcadores CD Este sistema de la nomenclatura se usa para las moléculas superficiales de leucocitos que se identifican por anticuerpos monoclonales. Más de 80 moléculas individuales son reconocidas por esta serie, y algunas de ellas se encuentran en células diferentes a los leucocitos.

corticosteroides Agentes que tienen numerosos efectos inmunosupresores y antiinflamatorios. Interfieren con la presentación del antígeno, inhiben la respuesta primaria del anticuerpo y reducen el número de los linfocitos T circulantes.

ciclofosfamida Medicamento que previene la replicación de DNA al unirse covalentemente a éste mediante una reacción de alquilación. Actúa principalmente en los linfocitos e inhibe fuertemente las respuestas de anticuerpos.

ciclosporina A Medicamento que se obtiene de un hongo e interfiere con los eventos tempranos de activación y transformación de linfocitos. Actúa principalmente en los linfocitos T y se ha convertido en el principal agente inmunosupresor usado después del trasplante.

citoquinas Sustancias liberadas por los leucocitos y otras células controlan el desarrollo de la respuesta inmune. A menudo denominadas las "hormonas del sistema inmune," modulan la diferenciación y la división de las células tronco hematopoyéticas así como la activación de los linfocitos y fagocitos.

citotoxicidad Término general para designar las maneras en las cuales los linfocitos, fagocitos mononucleares y granulocitos pueden matar a las células blanco.

complejo de histocompatibilidad El complejo de glucoproteínas en la superficie de las células que es usada por el sistema inmune para definir lo propio y lo ajeno.

inmunosupresión Las medidas usadas para reducir las respuestas inmunes y después del trasplante para prevenir el rechazo del injerto. La mayoría no son específicos para los antígenos de trasplante.

interleuquina-2 Una citoquina que es un factor esencial de crecimiento de linfocitos T, requerida para la división de los linfocitos T activados por antígeno.

complejo mayor de histocompatibilidad Un grupo grande de genes incluidos los que codifican las moléculas de clase I y II del complejo mayor de histocompatibilidad que participan en la presentación del antígeno a los linfocitos T. Se conoce ampliamente bajo su abreviatura inglesa MHC, por "Major histocompatibility Complex").

OKT3 Anticuerpo monoclonal murino dirigido contra el receptor de CD3 en los linfocitos T humanos. Se usa para que prevenir o tratar el rechazo agudo después del trasplante.

agentes antilinfocíticos policlonales Anticuerpos inmunosupresores producidos al inyectar material linfóide humano (bazo, timo, ganglio linfático) en un animal (caballo, cabra, oveja, conejo) que genera una respuesta de anticuerpos contra el tejido humano. La globulina inmune de animales se purifica y se usa para prevenir o tratar el rechazo en los pacientes de trasplante humano.

rechazo Reacción inducida por los linfocitos T del receptor que reconocen a las moléculas del MHC alogénico. Los linfocitos T pueden activar células mononucleares que infiltran injertos, dañando al injerto.



linfocitos T Linfocitos que se desarrollan en el timo y cuya función es reconocer los antígenos que se originan en el interior de las células del huésped como propios y los antígenos extraños como no propios.

tacrolimus (FK506) Compuesto obtenido de hongos que previene la activación de linfocitos T al inhibir los eventos tempranos de las señales de calcio. Es aproximadamente 100 veces más potente que la ciclosporina A y ha sido aprobado recientemente por la Administración de Alimentos y Medicamentos.

tipificación tisular Técnica empleada para determinar las especificidades principales de histocompatibilidad que tienen las células de un individuo.

tolerancia La adquisición de la falta respuesta a una molécula que normalmente es reconocida por el sistema inmune.

El trasplante de órganos sólidos se ha convertido en la terapia de elección para tratar las enfermedades terminales del riñón, hígado y corazón. Los adelantos en las técnicas quirúrgicas y las capacidades de diagnóstico, el progreso en la inmunología y el análisis de histocompatibilidad, el desarrollo de agentes inmunosupresores más específicos y potentes, las mejoras en el manejo del donante, y la preservación de órganos y los nuevos agentes antimicrobianos han contribuido al éxito en el trasplante de órganos sólidos. Un reflejo de estas mejoras es que el número total de trasplantes de cada tipo se triplicó en los Estados Unidos durante el último decenio (Tabla 50-1).

El término *injerto* se usa para describir un órgano trasplantado. Los *aloinjertos* se refieren al tejido que se toma de un individuo y se usa para un segundo individuo. Un aloinjerto de un pariente se denomina un *injerto del donante familiar vivo* (IDFV). Los aloinjertos de los individuos que han sido declarados legalmente muertos ("muerte cerebral") se denominan los *aloinjertos del cadáver*. Los trasplantes son procedimientos médicos de alto riesgo.

El factor principal que limita el trasplante es la escasez de órganos. A finales de 1994, la lista de espera para los trasplantes de órganos sólidos en los Estados Unidos excedió los 35,000. Esto representó un aumento de más de 100% con respecto a 1988. En los casos de las enfermedades del corazón y hepáticas, el no recibir un trasplante oportuno conduce a la muerte. De acuerdo a los registros, el porcentaje general de personas que murieron mientras esperaban un trasplante en 1993 fue 5.8%. Las tasas de mortalidad más altas fueron para los receptores del corazón y cardiopulmonares con 13.1% y 16.2% respectivamente.

A medida que los trasplantes han evolucionado, la función del laboratorio clínico claramente se ha tornado más definida. Este capítulo es una descripción de la utilidad de monitorear tanto a los donantes de trasplante como a los receptores de órganos sólidos.

Evaluación de Pretrasplantes

Ningún trasplante se realiza sin una investigación clínica minuciosa tanto del donante como del receptor. Cada órgano tiene criterios específicos que deben examinarse antes de que se realice el trasplante.

Donante vivo (riñón)



Las tasas de supervivencia de aloinjertos son mayores cuando el injerto se obtiene de un I en vez de un donante cadáver. Una segunda ventaja importante de los trasplantes de donantes vivos es la naturaleza del procedimiento, ahorrando al receptor el largo período de espera en la diálisis que ocurre con frecuencia cuando uno está esperando un trasplante de un cadáver apropiado. Una tercera razón del uso continuado de los donantes familiares es la escasez de los donantes cadáveres.

El donante potencial y el receptor deben evaluarse para demostrar la compatibilidad del tipo de sangre de ABO. Se debe realizar entre el donante y el receptor otra prueba de inmunocompatibilidad, llamada *compatibilidad cruzada de linfocitos T citotóxicos*. Esto asegura que el receptor no haya preformado anticuerpos contra el donante. Todos los donantes potenciales deben ser emocionalmente estables y deben comprender plenamente el proceso de donar un riñón. Los donantes potenciales se evalúan meticulosamente para asegurar que están en un estado de salud general excelente y que no hay ninguna contraindicación para la remoción de un riñón (Tabla 50-2). Una meta de esta evaluación es la detección de enfermedades insospechadas en el donante, como la diabetes, la hipertensión, la anemia, los cálculos renales, o alguna neoplasia maligna. Otra meta es detectar infecciones que pueden transmitirse al receptor. La meta del resto de los estudios es evaluar si la función renal y la estructura del aloinjerto renal potencial son completamente normales. La edad del donante familiar vivo potencial es obviamente importante. Los menores no son aptos para la donación de riñón, pero pueden usarse donantes más viejos, hasta 70 años de edad, si gozan de excelente salud. Los donantes renales a los que se ha dado seguimiento hasta 20 años después de la donación presentan una leve reducción en la tasa de filtración glomerular y un aumento moderado en la excreción proteína urinaria sin aumento en la hipertensión.

Donante cadáver

Los donantes cadáveres son individuos previamente sanos que padecen muerte cerebral irreversible. Una vez que son declarados legalmente muertos, se mantienen en un respirador y se les maneja clínicamente con líquidos y medicamentos apropiados para mantener la función cardiovascular, hasta que los órganos se extraen. Cada donante se somete a una extensa revisión de su historia clínica y rigurosas pruebas, tanto físicas como de laboratorio a fin de asegurar la función óptima del órgano. Los estudios de laboratorio obtenidos durante la admisión del paciente son importantes y establecen valores de comparación de los sistemas de órganos del individual. La Red Unida para Compartir Órganos (**UNOS**) ha establecido pruebas de laboratorio obligatorias (Tabla 50-3), aunque ocasionalmente pueden solicitarse pruebas adicionales. Por ejemplo, si el corazón o los pulmones del donante están considerándose para el trasplante, pueden ser ordenados en el momento de la evaluación un ecocardiograma, ECG, radiografía del tórax, y la medición de los niveles de creatina cinasa-MB.

Riñón.

La mayoría de los donantes cadáveres de riñón están entre 2 y 70 años de edad. Sin embargo, se han trasplantado con éxito los riñones de recién nacidos y de donantes mayores de 70 años de edad. Es necesaria una minuciosa historia médica pasada y presente del donante. Los estudios de laboratorio deben incluir aquellos enumerados en la Tabla 50-3, con atención específica en los resultados de creatinina sérica y en los niveles de urea en el análisis



de orina. Solamente los pacientes con valores de laboratorio que están dentro de los intervalos de referencia, o pacientes con valores de laboratorio o resultados clínicos que están regresando a la normalidad después del manejo, son aceptados generalmente como donantes cadáveres de riñón.

Hígado.

Se pueden usar con seguridad los hígados de donantes de individuos de hasta 70 años de edad. Los donantes de mayor edad que están lo bastante sanos como para permanecer hemodinámicamente estables después de la muerte cerebral pueden convertirse en donantes aceptables. Los antecedentes sociales y la causa de muerte son a menudo piezas valiosas de información para los donantes hepáticos potenciales. Las pruebas de laboratorio incluyen aquellas pruebas enumeradas en la Tabla 50-3 con especial atención a la bilirrubina, ASAT, ALAT y la fosfatasa alcalina. Son aceptables las elevaciones moderadas en los estudios de función hepática, especialmente si la tendencia es hacia el rango de referencia.

Páncreas.

En general, los donantes que son aceptables para los trasplantes renales hepáticos son también aceptables como donantes de páncreas. Las contraindicaciones principales para la aceptación de un donante para el trasplante de páncreas son una historia de diabetes y la pancreatitis aguda o crónica. La hiperglucemia se ve con frecuencia en los individuos después de un severo traumatismo craneoencefálico o como resultado de la administración de las soluciones que contienen glucosa. Estos factores no son una contraindicación para el restablecimiento del páncreas si el paciente no tiene ningún antecedente de diabetes. En los casos dudosos, la medición de los niveles de hemoglobina glucosilada puede demostrar que la función de páncreas de largo plazo ha sido normal. La amilasa sérica elevada no necesariamente es indicativa del traumatismo pancreático. La visualización directa del páncreas es la mejor manera de evaluar la lesión pancreática en los casos de traumatismo. La evidencia del traumatismo pancreático impide la remoción para trasplante. La edad del donante potencial no es generalmente un factor para los trasplantes pancreáticos, aunque los criterios edad son ligeramente más restrictivos que para los trasplantes renales.

Corazón.

La evaluación cardíaca del donante combina el interrogatorio, la exploración física, y las pruebas diagnósticas. Los problemas de contraindicación incluyen traumatismo del tórax contuso prominente, hipotensión prolongada, paro cardíaco, y síntomas cardíacos premórbidos. Si ocurrió traumatismo contuso o paro cardíaco, la medición de lactato deshidrogenasa sérica y los niveles isoenzimáticos de creatina cinasa, así como una radiografía del tórax y un ECG, pueden ayudar a juzgar la gravedad del daño al miocardio. En general, los individuos mayores que 50 años de edad no se consideran como donantes cardíacos aptos.

Receptor

Es esencial realizar una detallada evaluación médica y psicológica de todo los receptores potenciales de trasplante. Los pacientes deben estar suficientemente sanos y motivados para someterse al procedimiento quirúrgico, para resistir los problemas potenciales asociados con los agentes inmunosupresores y para cumplir con un régimen médico complejo



y demandante.

Renal

La evaluación pretrasplante del receptor de un riñón se enumera en la Tabla 50-4. La finalidad de esta evaluación es detectar cualquier problema que pueda disminuir las perspectivas de éxito del procedimiento y para tomar las medidas correctivas cuando sea necesario. No todos los pacientes con nefropatía terminal son candidatos a trasplante. Los pacientes de edad avanzada o con enfermedad sistémica prominente no son generalmente candidatos aceptables. La Sociedad Estadounidense de Médicos de Trasplantes ha publicado una lista de las contraindicaciones absolutas para trasplante, que incluye infección activa, enfermedad cardiovascular avanzada, enfermedad pulmonar avanzada, enfermedad hepática crónica grave, neoplasia maligna, vasculitis aguda o glomerulonefritis, enfermedad de vías urinarias inferiores no corregible, oxalosis primaria, una edad mayor que 70 años, obesidad mórbida, problemas psicosociales severos, abuso de drogas o alcohol, y compatibilidad cruzada positiva, actualizada de linfocitos T.

Otros receptores.

Se usan evaluaciones de laboratorio similares para evaluar a los receptores potenciales de hígado, corazón, páncreas y pulmones. La meta principal es asegurarse que el paciente esté suficientemente sano para sobrevivir la cirugía y las complicaciones de postrasplante asociadas con la inmunosupresión de por vida. Obviamente, las enfermedades cardíacas avanzadas no serían una contraindicación al trasplante de corazón pero serían una contraindicación al trasplante hepático. La infección activa, la neoplasia maligna, los problemas psicosociales graves y cualquier abuso activo de drogas o alcohol, son contraindicaciones para todos los trasplantes.

Diagnóstico Clínico y Patológico de Rechazo al Trasplante

El rechazo de aloinjertos es la destrucción de un órgano trasplantado que resulta de un ataque inmune desarrollado por el cuerpo del receptor. El órgano rechazado pierde la función. El proceso de vigilar la salud de un órgano trasplantado incluye un componente importante de pruebas de laboratorio.

El diagnóstico del rechazo de trasplantes es a menudo un proceso excluyente por el cual el clínico descarta otras complicaciones postrasplante. Por ejemplo, el rechazo renal debe diferenciarse de los efectos nefrotóxicos del medicamento ciclosporina A, que se usa para suprimir la respuesta inmune del receptor. El rechazo de aloinjertos hepáticos debe diferenciarse de la lesión hepática inducida por medicamentos, complicaciones quirúrgicas y hepatitis. Aunque las pruebas bioquímicas e inmunológicas y los síntomas clínicos pueden ser altamente sugestivos del rechazo de órganos, el diagnóstico definitivo se hace mediante el examen histológico del órgano trasplantado. Este es un procedimiento invasor que requiere una muestra del tejido del aloinjerto para examinarse mediante análisis microscópico.

El rechazo de aloinjertos puede ser causado por los linfocitos T del sistema inmune, los anticuerpos producidos por las células B o ambos. La diferenciación entre estos procesos se basa en el cuadro clínico, la sincronización del evento y el examen histológico. El *rechazo*



hiperagudo, definido como el inicio del rechazo del órgano minutos después del trasplante, ocurre porque los anticuerpos contra el tejido de donantes ya están presentes en el receptor. Las manifestaciones clínicas se observan inmediatamente después que se restaura el suministro de sangre al injerto. El *rechazo celular agudo* es un proceso mediado por células T y es la forma más común de rechazo. Puede ocurrir en cualquier momento después del trasplante, pero es sumamente común dentro de los 6 primeros meses después del trasplante. El *rechazo crónico* es una pérdida lenta, progresiva de la función del órgano que generalmente sigue a los episodios del rechazo celular agudo. La evolución del rechazo crónico es generalmente de meses a años.

Riñón

El rechazo hiperagudo del riñón es un acontecimiento poco común con las técnicas actuales de compatibilidad cruzada. Los coágulos se forman en las arterias renales, seguidas de necrosis de la corteza renal. El rechazo celular agudo varía desde las formas moderadas hasta las severas, dependiendo del grado de daño renal (Tabla 50-5). El rechazo crónico da lugar a un deterioro progresivo e irreversible de la función renal.

Hígado

El rechazo hiperagudo de los aloinjertos hepáticos ocurre rara vez en los donantes compatibles con ABO, sin embargo, la escasez de los donantes ha hecho que el trasplante hepático incompatible sea más común, por lo tanto aumenta el riesgo para este tipo de rechazo. El rechazo celular agudo de los aloinjertos hepáticos se caracteriza por la inflamación portal con un infiltrado linfocítico predominante. La gravedad del rechazo (Tabla 50-6) determinará la terapia a seguir. El rechazo crónico hepático, o "síndrome del conducto biliar desaparecido," se caracteriza por la colestasis progresiva y la función hepática en deterioro. La lesión de los conductos biliares es el resultado de una arteriopatía vascular que disminuye el suministro de sangre al árbol biliar.

Corazón

El rechazo hiperagudo en los aloinjertos cardíacos es sumamente poco común pero se ha observado tanto en los trasplantes ABO compatibles como en los incompatibles. Debido a la rapidez de este proceso, la supervivencia de pacientes y del injerto es generalmente baja. El rechazo celular agudo es detectado mediante biopsias seriadas del endomiocardio. La magnitud de la gravedad del rechazo celular agudo se basa en los criterios establecidos por la Sociedad Internacional del Trasplante de Corazón y Pulmón (Tabla 50-7). El rechazo crónico se manifiesta generalmente como una arteriosclerosis acelerada.

Páncreas

La biopsia rutinaria del páncreas para diagnosticar el rechazo se realiza con poca frecuencia debido a la alta morbilidad asociada con este procedimiento. El rechazo hiperagudo no ha sido descrito claramente en el aloinjerto pancreático. En el rechazo celular agudo, un infiltrado linfocítico de los vasos pequeños del aloinjerto produce daño a los acinos circundantes y a las arterias pequeñas del ductulo. El rechazo crónico conduce finalmente a la pérdida de la función pancreática tanto exocrina como endocrina.



Monitoreo de Laboratorio del Receptor de Trasplante

El desarrollo clínico de rechazo agudo de un órgano trasplantado da lugar generalmente a la destrucción progresiva de aloinjertos acompañada de la disfunción del órgano. El examen histopatológico del tejido trasplantado sigue siendo la norma para la determinación del rechazo después que se ha evidenciado clínicamente. Sin embargo, el éxito continuo del trasplante de órganos es en gran parte el resultado del uso de pruebas de laboratorio para detectar signos tempranos del rechazo y para monitorear el tratamiento. Estas pruebas miden los marcadores bioquímicos que reflejan el daño del aloinjerto del órgano y la función del órgano.

Riñón

La evaluación de laboratorio de la función renal después del trasplante emplea las mismas pruebas usadas rutinariamente para monitorear la función glomerular y tubular. El rechazo sigue siendo una causa importante de la disfunción renal después del trasplante del riñón, pero la nefrotoxicidad de ciclosporina A, las enfermedades recurrentes, las infecciones, y las complicaciones vasculares pueden causar disfunción renal en estos pacientes. El análisis de rutina de creatinina sérica y urea sigue siendo la medida clínica más práctica de la función renal. Los incrementos en creatinina sérica son a menudo la indicación inicial de las complicaciones renales de postrasplantes. Tanto el grado de aumento de creatinina como la velocidad de dicho ascenso son importante en el diagnóstico. La velocidad de aumento de creatinina sérica, en combinación con otros resultados clínicos e histopatológicos (Tabla 50-8), puede usarse para diferenciar el rechazo agudo de la nefrotoxicidad por ciclosporina A. Otros resultados de la química sérica pueden tener alguna utilidad en este diagnóstico diferencial.

La disfunción tubular inducida por ciclosporina A puede causar elevaciones en el potasio sérico, bicarbonato y ácido úrico, mientras que causa una disminución en el magnesio sérico. Las alteraciones en la excreción urinaria de sodio y potasio son compatibles con la nefrotoxicidad de ciclosporina A. Las pruebas funcionales como la manometría renal, la ultrasonografía, la generación de imágenes por resonancia magnética y las exploraciones con radioisótopos pueden delinear aún más la causa de la disfunción del aloinjerto renal.

Páncreas

Debido a que el páncreas se trasplanta generalmente en combinación con el riñón, los marcadores bioquímicos de la función renal a menudo se utilizan como indicadores tempranos del estado del trasplante pancreático. Los aumentos en la amilasa sérica y glucosa ocurren muy al final del proceso de rechazo de páncreas y siguen siendo en gran parte poco seguros como indicadores del rechazo temprano de aloinjertos. La mayoría de los trasplantes de páncreas se realiza de manera que las enzimas pancreáticas se drenen en la vejiga. En consecuencia, se ha visto que la disminución de los niveles de amilasa urinaria correlacionan con la disfunción temprana de trasplante pancreático. La frecuencia de esta prueba es un factor importante en su sensibilidad para detectar el rechazo de aloinjertos. La mayoría de los

centros monitorean inicialmente los niveles de amilasa urinaria diariamente o al menos tres veces por semana. Otras enzimas pancreáticas como el tripsinógeno también pueden ser útiles. Los resultados citológicos del líquido pancreático también pueden ser de valor diagnóstico; un aumento en los linfocitos y blastocitos es indicativo del rechazo, mientras que un predominio de los neutrófilos es más característico de una infección. Las pruebas funcionales que evalúan la respuesta de insulina a la carga de glucosa también pueden ser útiles para la evaluación de la reserva pancreática.

Hígado

Los marcadores bioquímicos se usan habitualmente para vigilar la función del aloinjerto hepático. Las diversas pruebas utilizadas para evaluar la función hepática pueden dividirse en dos categorías: (1) las *pruebas estáticas*, que permiten evaluar la función hepática indirectamente al medir las sustancias producidas por el hígado, y (2) las *pruebas dinámicas*, que miden directamente las capacidades metabólicas y de depuración del hígado.

Las pruebas estáticas.

En general, las concentraciones séricas de bilirrubina, fosfatasa alcalina, aspartato aminotransferasa (ASAT) y alanina aminotransferasa (ALAT) son pruebas de función hepática comúnmente usadas. Estas pruebas se evalúan diariamente durante las primeras semanas del período de postrasplante. La frecuencia de evaluación disminuye en la medida que se demuestra la función estable del injerto y se incrementa cuando ocurre disfunción hepática. Otras pruebas de los compuestos analizado séricos, como lactato deshidrogenasa (LD), 5'-nucleotidasa (5-NT) y gama-glutamyltransferasa (GGT) se consideran pruebas secundarias y pueden no formar parte del monitoreo estándar después del trasplante hepático. Los aumentos pequeños de las pruebas hepáticas estándar no indican necesariamente el rechazo de aloinjertos hepáticos. Sin embargo, los incrementos seriados menores o iguales al 25% durante varios días se consideran un indicador confiable de la disfunción del aloinjerto hepático.

Los resultados de las pruebas de función hepática, como la bilirrubina, fosfatasa alcalina, ASAT y ALAT, no siempre indican el rechazo del trasplante, ya que las evaluaciones de los resultados de las pruebas también se asocian con otras condiciones clínicas (Tabla 50-9). Por ejemplo, aunque la bilirrubina sérica y la fosfatasa alcalina se eleven progresivamente con el desarrollo de rechazo celular agudo, también ambas se elevan durante la colestasis secundaria a la obstrucción biliar, la toxicidad a medicamentos, las lesiones producidas en el proceso de preservación de órganos antes del trasplante, y las infecciones. Los aumentos tempranos en las aminotransferasas séricas pueden ocurrir con rechazo pero los incrementos se tornan progresivamente mayores (>2 veces el límite superior del valor normal) en los casos graves. Las elevaciones agudas de ASAT y ALAT son también reflejo de una lesión hepatocelular isquémica, necrosis y hepatitis. Los marcadores séricos de la función de síntesis hepática (proteínas séricas, amoníaco sérico y factores de coagulación) se vuelven en general anormales como resultado de enfermedades hepáticas progresivas de muchos años o por insuficiencia hepática fulminante severa. En general, las pruebas estáticas son indicadores tempranos sensibles de la disfunción del aloinjerto hepático pero no son específicas para el rechazo.

Las pruebas dinámicas.

Se han desarrollado pruebas dinámicas de la función hepática en un intento de medir el estado funcional del hígado. Las pruebas dinámicas evalúan la capacidad del hígado de depurar o metabolizar diversos sustratos. Varias de estas pruebas se han evaluado ampliamente como parte de la evaluación clínica de los donantes y receptores de trasplante hepático (Tabla 50-10).

El estado de la oxigenación hepatocelular se refleja por la relación del acetoacetato sérico (AcAc) a 3-hydroxybutyrate (HB), conocido como la razón de cuerpos cetónicos (RCC). A medida que disminuyen el estado de oxigenación del hígado y la razón de NAD/NADH, se forma más HB a partir de AcAc. Clínicamente, una RCC de <0.7 se asocia con función hepatocelular disminuida tanto en los donantes del aloinjerto hepático como en los receptores.

También se ha examinado la depuración hepática de las sustancias exógenas para evaluar el estado hepático. El verde de indocianina (VIC) se elimina de la sangre por el hígado y es excretado a la bilis sin cambios. Su eliminación de la sangre es principalmente un reflejo del flujo sanguíneo hepático. Otra medida de metabolismo hepatocelular es la capacidad de eliminación de galactosa (CEG), que consiste en la saturación de la enzima responsable de la eliminación de la galactosa en la sangre. El metabolismo de lidocaína y la formación de su metabolito de oxidación primario monoetilglicinaxilidida (MEGX) reflejan tanto la actividad del citocromo P-450 como el flujo sanguíneo hepático. Se ha correlacionado clínicamente la formación de MEGX con grados variables de función hepática tanto en los donantes como en los receptores. Otros agentes exógenos que se han evaluado como marcadores dinámicos potenciales de la función hepática incluyen la antipirina, cafeína, lorazepam y debrisoquina. Una limitación de estas pruebas dinámicas es que parecen ser un indicador sensible de lesión hepática pero no de regeneración hepática después del trasplante. La función del monitoreo dinámico del receptor después del trasplante hepático requiere de evaluación clínica adicional.

Corazón

El uso de los marcadores bioquímicos para la evaluación de las complicaciones de aloinjertos cardíacos está limitado por el mecanismo del rechazo de este órgano. En los aloinjertos no cardíacos, la causa de las alteraciones bioquímicas observadas es la lesión a las células epiteliales. A diferencia del riñón, el hígado o el páncreas, el corazón carece de células epiteliales como blanco principal para el rechazo. Por lo tanto, en los receptores de aloinjertos cardíacos, los cambios en los niveles de los compuestos analizados que se utilizan para medir la función cardíaca, como la creatina cinasa, mioglobina, LD, y ASAT, no tienen correlación clínica con el rechazo. La electrocardiografía, la ecocardiografía, y la exploración con radionúclidos son de valor solamente en la determinación del estado funcional tardío del rechazo y no son los indicadores confiables del rechazo temprano de aloinjertos. Debido a la falta de marcadores sensibles y específicos del rechazo, las biopsias rutinarias de endomiocardio seriadas son el estándar para el monitoreo de aloinjertos cardíacos de postrasplantes.

Monitoreo Farmacológico



El mejoramiento continuo de las terapias inmunosupresoras para los receptores de trasplante depende del monitoreo apropiado de estas terapias y de un ajuste óptimo de los múltiples regímenes de tratamiento con inmunosupresores. Las elecciones disponibles para la terapia inmunosupresora se han ampliado y ahora incluyen no solo la irradiación, los esteroides y los antimetabolitos, sino también la ciclosporina A, el tacrolimus y los agentes antilinfocíticos policlonales y monoclonales (Tabla 50-11).

Los protocolos inmunosupresores varían con el tipo del órgano, el estado del paciente, y las filosofías de tratamiento del médico y del centro de trasplantes. La terapia inmunosupresora de postrasplante puede incluir una terapia farmacológica simple, doble, triple, o aún cuádruple (Tabla 50-11).

Corticosteroides

Entre los primeros compuestos que se encontraron con actividad inmunosupresora están los corticosteroides. La unión de los glucocorticoides a sus receptores bloquea la síntesis o la liberación de las linfoquinas y las citoquinas. Esto conduce a una inhibición de la respuesta de linfocitos T a la estimulación, una redistribución de linfocitos del sistema vascular al linfático, y una disminución en el número de linfocitos T y células B circulantes. La respuesta celular inmune se mitiga, pero casi no se ve ningún efecto inmunosupresor en la respuesta humoral (producción de anticuerpos).

La dosificación total de esteroides es en general muy alta (100 a 500 mg/día) en el período inmediato al postrasplante pero se reduce a 10 a 20 mg diariamente durante las 2 semanas posteriores al trasplante. A menudo se usan dosis adicionales de corticosteroides intravenosas u orales para tratar los episodios de rechazo agudo. Ya que el hígado y el riñón son los órganos principales que metabolizan los glucocorticoides, la disfunción de estos órganos puede requerir una modificación en la dosificación.

Los efectos adversos agudos asociados con corticosteroides incluyen hipertensión, intolerancia a la glucosa, hiperlipidemia causada por el metabolismo alterado de lípidos, equilibrio de calcio negativo y enfermedad ósea, el retraso del crecimiento en niños, aumento de peso, cambios psicológicos, deficiente curación de heridas y cataratas. Estos efectos adversos agudos pueden ser nuevos síntomas o se pueden ver como un empeoramiento de las condiciones preexistentes. Los efectos agudos están relacionados más frecuentemente con la dosis y disminuyen a medida que el paciente recibe dosis menores. Los efectos adversos asociados con la terapia de glucocorticoides de largo plazo conducen al desarrollo de un cuadro similar al de la enfermedad de cushing, osteoporosis o necrosis avascular ósea, y enfermedades cardiovasculares secundarias a la hipertensión e hiperlipidemia.

El metabolismo hepático de los corticosteroides puede ser afectado por las interacciones de múltiples fármacos. Los inductores de las enzimas de citocromo pueden aumentar la capacidad oxidativa del hígado y causar una disminución en los niveles de esteroides a una dosis dada, mientras que los inhibidores de las enzimas de citocromo tienden a prevenir la degradación y eliminación los esteroides circulantes. Generalmente no se realiza ningún monitoreo rutinario específico de corticosteroides. La dosificación es dictada normalmente por los protocolos y por la respuesta inmune del paciente, con el fin de reducir al mínimo los efectos colaterales,



Azatioprina y ciclofosfamida

La azatioprina es un fármaco precursor de la 6-mercaptopurina, la cual es un potente inhibidor de la proliferación celular. Inhibe el metabolismo de purina y por lo tanto interfiere en la replicación de los ácidos nucleicos. La azatioprina disminuye la expansión clonal de los linfocitos, dando lugar a la supresión de la función de la médula ósea y de la respuesta celular inmune. La azatioprina es administrada por vía oral una vez al día. Las dosificaciones estándar varían de 1 a 2 mg/kg/día. Se puede requerir reducir las dosificaciones si ocurre mielosupresión. Si ocurre una leucopenia significativa (niveles reducidos de leucocitos), la terapia de azatioprina puede ser suspendida momentánea o permanentemente. La terapia de azatioprina se monitorea principalmente mediante el seguimiento del conteo de leucocitos (GB). En general, las dosis totales de azatioprina se mantienen mientras la cuenta de leucocito está por encima de $5000/\text{mm}^3$. Las dosificaciones son reducidas a la mitad si la cuenta de leucocitos disminuye dentro del rango de 3000 a $5000/\text{mm}^3$, y se suspenden cuando la cuenta de leucocitos cae por debajo de 3000 leucocitos/ mm^3 , al menos hasta que la leucopenia sea resuelta. La administración aguda del factor de estimulación de colonias granulocíticas (FEC-G) puede usarse para mitigar la mielosupresión.

La ciclofosfamida es un precursor de las mostazas de nitrógeno, que se activa en el hígado. Actúa como un agente alquilante e interrumpe la división celular, teniendo el efecto mayor sobre las células que se dividen rápidamente como los linfocitos. Es más tóxico y más difícil de tolerar que la azatioprina. Su uso como inmunosupresor está limitado generalmente a los casos de intolerancia a azatioprina, lo cual es habitualmente resultado de la hepatotoxicidad.

Ciclosporina A

La ciclosporina A transformó la práctica del trasplante de un procedimiento experimental al tratamiento de elección para la insuficiencia terminal del órgano. Es un péptido cíclico de 11 residuos, químicamente neutral y predominantemente hidrofóbico. La ciclosporina A se formula para la administración oral en una solución de aceite de oliva o en cápsula del gel y para la administración intravenosa (IV) como un dispersante de agentes tensoactivos. La avidez de la ciclosporina A por las superficies hidrofóbicas ha causado cierta preocupación. La dosificación puede reducirse peligrosamente debido a su adsorción a recipientes plásticos para beber, sondas alimentarias nasogástricas, y tubería IV. Se cree que la ciclosporina A causa inmunosupresión al inhibir la síntesis y liberación de interleuquina-2 (IL-2) y otras linfoquinas. La ciclosporina A logra esto a través de inhibir los eventos tempranos dependientes de calcio en la transducción de señales durante la activación de linfocitos T.

Farmacocinética.

La absorción de la ciclosporina A después de la dosificación oral es muy variable. Se absorbe aproximadamente un tercio de la dosis, pero su biodisponibilidad puede variar de un 5% a un 90%. La absorción intestinal es coadyuvada por la grasa alimentaria y la excreción de los líquidos biliares. Los pacientes con diarrea, náusea, vómitos, o secreción reducida de bilis pueden tener una biodisponibilidad significativamente reducida de ciclosporina A



administrada oralmente. Los niveles sanguíneos máximos ocurren 2 a 6 horas después de la dosificación oral.

La ciclosporina A se distribuye ampliamente en los tejidos. Debido a su naturaleza hidrofóbica se une fuertemente y puede ser detectada en el tejido hasta 2 semanas después de la interrupción de la terapia. Aproximadamente 10% de ciclosporina A en la sangre se transporta en los leucocitos, mientras que un 40% a un 60% se lleva en los eritrocitos; el resto se acarrea en el plasma unida a las lipoproteínas.

La unión a los eritrocitos es un proceso no lineal independiente de la temperatura y puede cambiar con el hematocrito. Esta variabilidad en la distribución dentro de fracciones sanguíneas ha requerido que la sangre entera anticoagulada con EDTA sea el espécimen habitualmente usado para el análisis clínico.

La ciclosporina A experimenta un metabolismo hepático extenso. Muchos cambios se producen en las cadenas laterales extendidas, pero poca o ninguna modificación ocurre en la configuración central cíclica. Las oxidasas microsomales, especialmente la isoenzima del citocromo P-450III_{A4}, son responsables del metabolismo. Estas oxidasas están presentes en la mucosa intestinal y juegan un papel importante en el metabolismo intestinal de ciclosporina A. La mayoría de los metabolitos identificados experimentan oxidación o N-desmetilación.

La eliminación de la ciclosporina A es principalmente a través de la excreción hepatoiliar con eliminación en las heces. Las concentraciones urinarias de la ciclosporina A y sus metabolitos representan menos del 10% de la dosis administrada.

Efectos adversos.

Los efectos adversos graves relacionados con el tratamiento de ciclosporina A son nefrotoxicidad relacionada con la dosis, hipertensión, neurotoxicidad, hiperplasia gingival, hirsutismo, hiperlipidemia, e intolerancia a la glucosa. Muchos de estos efectos colaterales son similares a los efectos colaterales del tratamiento de corticosteroides, además de su gravedad. Así mismo existen riesgos generales por exceso de inmunosupresión, con un riesgo mayor de infecciones virales crónicas, que, aunque son principalmente inocuas en la población general, pueden ser una amenaza para el paciente de trasplante. Puede ocurrir nefrotoxicidad tanto aguda como crónica. Al principio del postrasplante, cuando la dosificación y los niveles de ciclosporina A son los más altos, hay una mayor probabilidad de que ocurra nefrotoxicidad aguda inducida por ciclosporina A. Esta toxicidad se manifiesta como una reducción en el flujo sanguíneo renal, tasa de filtración glomerular, y producción de orina. Puede ser difícil distinguir esta nefrotoxicidad del rechazo agudo en los trasplantes renales (ver Tabla 50-8). Generalmente, estos efectos de corto plazo pueden revertirse cuando uno disminuye la dosis de ciclosporina A. La administración de largo plazo de la ciclosporina A y la vasoconstricción renal asociada puede conducir a una nefropatía caracterizada por fibrosis intersticial. Secundarias a la nefropatía crónica están la hipertensión y hiperuricemia. Las estrategias más comúnmente utilizadas para tratar estos efectos colaterales crónicos son la reducción de las dosis de ciclosporina A o el cambio a terapias alternativas.

Interacciones farmacológicas.

Las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de la ciclosporina A pueden ser afectadas por muchos medicamentos que se usan comúnmente para tratar a los receptores de trasplante (Tabla 50-12). Pueden ocurrir interacciones de fármacos con ciclosporina A como



resultado de una alteración de los parámetros farmacocinéticos, una alteración del efecto fisiológico o farmacológico, o una combinación de estos efectos. Los mecanismos más comunes de estas interacciones farmacológicas son la inducción o la inhibición del sistema de citocromo P-450, que da lugar a una reducción o a un aumento en los niveles de ciclosporina sanguínea A respectivamente. Se sugiere un monitoreo estrecho del paciente cuando se inicia o se interrumpe la administración de los medicamentos que se sabe que interactúan con ciclosporina A. Este monitoreo incluye la evaluación de la función del órgano y los efectos adversos conocidos de ciclosporina A así como la medición de las concentraciones sanguíneas de ciclosporina A.

Monitoreo.

Desde su introducción, el monitoreo de la ciclosporina A ha sido usado por la mayoría de los centros de trasplante para optimizar la inmunosupresión mientras se reduce al mínimo la toxicidad. El avance en la tecnología para el monitoreo de ciclosporina A así como los cambios en los protocolos inmunosupresores, ha dificultado establecer rangos terapéuticos apropiados (Tabla 50-13). Los rangos terapéuticos son a menudo específicos para cada institución con diferentes rangos desarrollados para cada tipo de órgano y para diferentes tiempos después del trasplante (Tabla 50-14). La respuesta clínica no correlaciona con la dosis como resultado de la variabilidad en la farmacocinética y farmacodinámica de ciclosporina A. El monitoreo frecuente de los niveles de ciclosporina A es particularmente valioso cuando uno está vigilando la evolución de pacientes individuales. Las técnicas de ensayo varían de institución a institución, pero se recomiendan los ensayos específicos para los medicamentos que se administraron originalmente. La sangre entera es la matriz de elección y el monitoreo de niveles directo es el estándar de la práctica. El monitoreo frecuente poco después del trasplante se realiza en muchos centros con monitoreo diario de preferencia. La frecuencia de monitoreo disminuye después de la descarga del paciente del hospital, y en general se lleva a cabo cuando el paciente se evalúa en un consultorio de atención ambulatoria. Esto puede ocurrir tan a menudo como tres veces por semana poco después del trasplante, pero lo más espaciado que puede ocurrir es cuando mucho tres o cuatro veces por año. La magnitud del monitoreo aumenta en general cuando se producen cambios fisiológicos en el receptor de trasplante (rechazo, infección, toxicidad del medicamento y otros).

Tacrolimus

El Tacrolimus (FK506), un nuevo inmunosupresor de la clase de antibióticos que contienen una lactona de anillo grande, es un potente y selectivo agente antilinfocitos T que tiene un modo de acción similar al de la ciclosporina A. Ha sido aprobado por la FDA para usarse en los receptores de trasplante hepáticos y muchos estudios en curso están evaluando su uso en otros tipos de trasplante. El Tacrolimus es aproximadamente 100 veces más potente que la ciclosporina A y ha sido particularmente notable al tratar rechazos que anteriormente no podían controlarse.

La farmacocinética del tacrolimus presentan muchas de las características que muestra la ciclosporina A. Su absorción intestinal, es mala, errática e incompleta, aunque parece ser menos dependiente de la disponibilidad de bilis que la de la ciclosporina A. En el plasma, el

medicamento se une principalmente a una α_1 -glucoproteína ácida, mientras que en la sangre entera se encuentra principalmente en los eritrocitos. El tacrolimus es metabolizado por el sistema microsomal del citocromo P-450 hepático y del intestino delgado. Después del metabolismo hepático, más del 95% del medicamento es eliminado por la ruta biliar. Las interacciones de fármacos con tacrolimus son probablemente muy similares a las de ciclosporina A, aunque esto no está bien estudiado.

La variabilidad en las concentraciones sanguíneas debido a la farmacocinética errática y las interacciones farmacológicas junto con los efectos inmunosupresores y las toxicidades dependiente de la dosis, justifican el monitoreo cuidadoso de este medicamento. La correlación entre las concentraciones de tacrolimus y su eficacia o toxicidad son todavía poco claras. Muchos centros de trasplante tienen como objetivo la medición de niveles de 5 a 20 ng/mL en sangre total.

Preparaciones antilinfocíticas policlonales

Los agentes antilinfocíticos policlonales se usaron por primera vez en trasplantes clínicos en 1967. Una inmunoglobulina antihumana es preparada del suero de caballo, conejo o cabra inmunizados con ganglios linfáticos humanos, timo o bazo. El efecto de estos agentes depende de la sincronización y la dosis. Se logra una inmunosupresión transitoria pero significativa mediante la remoción de los linfocitos de la circulación. Esta terapia se utiliza con mayor frecuencia para reducir la actividad del sistema inmune sumamente estimulado durante los primeros días después del trasplante y durante episodios de rechazo graves. Los agentes antilinfocíticos son administrados en general intravenosamente. Se puede evaluar el progreso y la eficacia de la terapia antilinfocítica mediante el monitoreo de la cuenta de linfocitos, la cuenta total de células T, o los subconjuntos de linfocitos T como las células CD2⁺ o CD3⁺. La disminución en la cuenta de linfocitos T es una indicación general de la inmunosupresión debida a la eliminación de los linfocitos. La eficacia del tratamiento con preparaciones antilinfocíticas policlonales puede comprometerse por el desarrollo de anticuerpos del paciente contra la fuente animal de los antisueros.

OKT3

Los anticuerpos antilinfocíticos monoclonales tienen mejor especificidad que las preparaciones policlonales. En vez de dirigirse a todos los linfocitos o timocitos, puede elegirse un subconjunto específico de células para la supresión. El anticuerpo monoclonal de ratones, OKT3, se usa ampliamente para prevenir y tratar el rechazo agudo. OKT3 en general se administra intravenosamente (5 mg/día) por 7 a 14 días. Su efecto adverso más observado se conoce como *síndrome de liberación de citoquina*. Los síntomas incluyen fiebre, edema pulmonar, disnea, e hipotensión progresiva. Una consideración adicional en el uso de OKT3 es que el paciente puede desarrollar anticuerpos contra la proteína de ratón (anticuerpo humano anti-ratón, AHAR). Esta respuesta puede ocurrir tan rápido como 3 a 10 días después de la primera exposición del paciente a OKT3, pero en general no aparece hasta después de la suspensión de la terapia. Los anticuerpos producidos pueden ser isotípicos, en cuyo caso no hay ninguna interferencia terapéutica; o pueden ser idiotípicos, en cuyo caso ellos neutralizan la actividad de OKT3.

La terapia con OKT3 puede ser monitoreada por varios medios. La medición de



subconjuntos de linfocitos, específicamente las células $CD3^+$, es el indicador primario de la eficacia de OKT3. La cuenta $CD3^+$ por debajo de un rango de 10 a $50/mm^3$ se considera indicativo de una inmunosupresión eficaz. La concentración sérica de OKT3 puede medirse mediante diversos inmunoensayos y por citometría de flujo. Generalmente se considera terapéutico un nivel sérico directo de OK3 de 500 a 1200 ng/mL. La presencia de una respuesta de un título alto de AHAR conducirá a una disminución de la eficacia y es una contraindicación a un posible tratamiento nuevo de OKT3. El título de AARH es evaluado por la técnica de ELISA durante y después del tratamiento.

Monitoreo Inmunológico

Pruebas de antígenos de leucocitos humanos

El sistema inmune del huésped discrimina lo propio de lo no propio al reconocer los antígenos de leucocitos humanos (HLA) en el complejo principal de histocompatibilidad. La complementariedad de HLA o el sistema de pruebas de histocompatibilidad, se utiliza para ayudar a predecir la compatibilidad del tejido del donante con un receptor potencial. Los HLAs que participan en el rechazo de trasplantes están divididos en dos grupos moleculares: las moléculas de HLA de clase I y las moléculas de HLA de clase II. Las moléculas de HLA de clase I comprenden dos loci antigénicos, HLA-A y HLA-B, que se encuentran en la superficie de la mayoría de las células. De igual manera, las moléculas de HLA de clase II tienen tres loci antigénicos primarios: HLA-DR., HLA-DQ y HLA-DP, pero estos antígenos se encuentran principalmente en los linfocitos B y en los macrófagos. Cada locus antigénico tiene dos haplotipos antigénicos, los cuales se identifican para tipificar.

En general, una prueba de linfotoxicidad dependiente del complemento se usa para la tipificación tisular. El tejido desconocido, un linfocito, se expone a una amplia batería de antiseros estandarizados de especificidad conocida para HLA. Si los antiseros se unen a la célula, el complemento es fijado, y el linfocito muere, y tal respuesta indica que el HLA de la célula es similar al de los antiseros conocidos. Las moléculas HLA de clase I se tipifican como una preparación mixta de linfocitos, mientras que los antígenos de clase II requieren en general una preparación enriquecida de linfocitos B para una tipificación adecuada. El proceso de tipificación de HLA habitualmente toma varias horas, lo que puede ser un paso limitante de para utilizar esta prueba en el ambiente clínico.

Las implicaciones y la utilidad clínica de la tipificación de HLA varían según el órgano trasplantado. En general, la tipificación de HLA se usa clínicamente solo para establecer la compatibilidad de los donantes y receptores del aloinjerto renal. Seis antígenos compatibles de un donante cadáver y un receptor son conectados automáticamente a través de la red Unida para Compartir Órganos; todos los demás acoplamientos se basan en una combinación de la compatibilidad del HLA, la negatividad de la compatibilidad cruzada, la condición del anticuerpo reactivo a la batería de pruebas (ver abajo), la urgencia médica, la ubicación geográfica, y el período de tiempo en la lista de espera del receptor.

Los datos iniciales indicaban que la supervivencia a corto y largo plazo de aloinjertos renales era fuertemente modulada por la compatibilidad de HLA-A, HLA-B y HLA-DR. Aunque la introducción de la ciclosporina A ha reducido el efecto de la compatibilidad de HLA en la supervivencia a corto plazo del injerto, la supervivencia a largo plazo todavía parece ser dependiente de HLA. Se ha calculado que la vida media de los trasplantes renales

compatibles por HLA de los donantes cadáveres es del doble que para los donantes no compatibles (17.3 años contra 7.8 años; ver a Takemoto et al. en la bibliografía). Se ha demostrado que el uso de HLA compatible mejora la supervivencia del injerto en los pacientes con trasplantes de corazón. Sin embargo, la escasez de los órganos, combinada con un tiempo mínimo de preservación, han hecho que la tipificación de HLA sea impráctica en esta población. Parece que hay un beneficio limitado del HLA compatible en los receptores del aloinjerto hepático, aunque hay alguna evidencia que indica un posible efecto adverso en la supervivencia del injerto sin HLA compatible. Existen datos limitados en lo referente a los efectos de HLA compatible en la supervivencia de aloinjertos de páncreas y el pulmón.

Batería de pruebas de anticuerpos reactivos

La batería de pruebas de anticuerpos reactivos (BAR) se realiza con una frecuencia de hasta una vez que al mes para la evaluación de anticuerpos anti-HLA en los candidatos de trasplante. La aparición de estos anticuerpos es en general el resultado de transfusiones de sangre, embarazo y trasplantes anteriores. Las pruebas de BAR emplean un ensayo serológico de linfotoxicidad mediado por complemento. El suero del recipiente se hace reaccionar con una batería de referencia de células que representan las especificidades conocidas de HLA. El resultado se expresa como un porcentaje, donde el 100% representa la sensibilización contra toda la batería de los anticuerpos de HLA. Se les da prioridad a los receptores de trasplante renales con una compatibilidad cruzada negativa de linfocitos T que están altamente sensibilizados, sobre aquellos pacientes con sensibilización inferior. Los resultados de la prueba de BAR no se utilizan generalmente en los trasplantes de corazón y hepáticos para la evaluación de la compatibilidad del donante y del receptor.

Compatibilidad cruzada de linfocitos

La compatibilidad cruzada de linfocitos se usa para detectar anticuerpos citotóxicos específicos del donante en el receptor. Los linfocitos donantes purificados se hacen reaccionar contra los sueros de los receptores. Se realiza una compatibilidad cruzada tanto de linfocitos T como de células B. Una compatibilidad cruzada positiva puede permitirle a uno predecir la probabilidad del rechazo hiperagudo. Los trasplantes renales no se realizan cuando hay una compatibilidad cruzada positiva. La urgencia de los trasplantes de corazón requiere que la cirugía se realice generalmente antes de que los resultados de compatibilidad cruzada estén disponibles. Si se encuentra una compatibilidad cruzada positiva en un paciente con trasplante de corazón, se establece generalmente una mayor inmunosupresión además de la plasmaféresis. La compatibilidad cruzada tienen poco valor predictivo en los receptores de trasplante hepáticos.

Cultivos de linfocitos mixtos

Aunque las pruebas serológicas de las diferencias de HLA proporcionan una indicación inicial de la compatibilidad entre el donante y el receptor, se ha desarrollado una prueba más específica para evaluar el grado de incompatibilidad antigénica. Este procedimiento, conocido como *la prueba del cultivo mixto de linfocitos (CML)*, permite evaluar el grado de histocompatibilidad del antígeno activador primario, los HLAs de clase II. La prueba de CML se basa en el principio de que dos células de diferente composición en términos de HLA se

activarán y proliferarán al ser expuestas mientras que las células con HLA idéntico permanecerán sin ser estimuladas. A mayor el grado de disparidad antigénica, mayor será la cantidad de actividad celular y por consiguiente el potencial para el rechazo del injerto. En general, los dos tipos de células en cuestión se incuban durante 5 ó 6 días, permitiendo que interactúen y se activen entre sí. El grado de síntesis de DNA celular, determinado por marcaje radioisotópico, es equivalente a la cantidad relativa de activación de linfocitos T. Debido al período de tiempo requerido para realizar la prueba, el uso clínico principal de la prueba de CML consiste en la evaluación de donantes familiares vivos potenciales.

Monitoreo del receptor soluble de interleuquina-2

La expresión y liberación del receptor soluble de interleuquina 2 (R-IL-2s) es una indicación de la activación de linfocitos T. El uso de R-IL-2s para el monitoreo inmunológico se ha evaluado en el receptor de trasplante como un parámetro predictivo, no invasor, del rechazo de aloinjertos agudos. Se han desarrollado inmunoensayos enzimáticos para usarse con diversas matrices biológicas, realizándose la mayor parte del monitoreo con suero. Se han observado elevaciones significativas en los niveles séricos de R-IL-2s durante el rechazo celular en receptores de aloinjertos de riñón, riñón/páncreas, hígado y corazón. Además, los niveles urinarios y biliares de R-IL-2s correlacionan con el rechazo en los trasplantes del riñón e hígado respectivamente. También se han usado los niveles de R-IL-2s en suero y orina para distinguir entre el rechazo agudo y la nefrotoxicidad de ciclosporina A en los receptores de trasplante renal. Además, se ha mostrado que los niveles de R-IL-2s son útiles en el diagnóstico y monitoreo de las complicaciones infecciosas en los pacientes de trasplante; los niveles de R-IL-2s se elevan en las infecciones virales pero no en las infecciones bacterianas. El incremento de los niveles ocurre hasta 2 semanas antes del diagnóstico clínico del citomegalovirus, y tal elevación demuestra que el monitoreo prospectivo seriado puede proporcionar una indicación temprana de la respuesta inmune del huésped a la infección viral.

Conclusión

La función del laboratorio clínico en el proceso de trasplante se ha tornado bien definida. El trasplante con éxito depende de un enfoque multidisciplinario incluida la cirugía, medicina, enfermería, radiología, patología, farmacología, nutrición y la psiquiatría. El monitoreo de los donantes y receptores de trasplante entrelaza y une a estas diversas áreas. Aunque las exigencias y responsabilidades que el trasplante plantea para los laboratorios clínicos pueden ser grandes, las recompensas vistas en los éxitos de los pacientes son aún mayores. Los futuros avances en la ciencia de los trasplantes incluyen nuevos procedimientos (trasplante de intestino delgado, trasplantes de islotes pancreáticos), nuevos agentes inmunosupresores (ácido micofenólico, mofetil, rapamicina, brequinar, leflunomida, desoxispergualina y mizorbina), y nuevas soluciones a problemas anteriormente insolubles (xenotrasplante y la inducción de tolerancia). A medida que crece el campo de la ciencia de los trasplantes, las responsabilidades del laboratorio cambiarán para abordar cada nuevo desarrollo.



Bibliografía

- 1993 *Annual Report*, U.S. Scientific Registry of Transplant Recipients and the Organ Procurement and Transplantation Network.
- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS, editors: *Cellular and molecular immunology*, Philadelphia, 1994, Saunders.
- Balistreri WF, A-Kader HH, Setchell KDR, et al: New methods for assessing liver function in infants and children, *Ann Clin Lab Sci* 22:162-174, 1992.
- First MR: Pre-transplant evaluation and preparation of donors and recipients. In Jacobson HR, Striker GE, Clark SS, editor: *The principles and Practice of nephrology*, St. Louis, 1995, Mosby.
- Flye MW, editor: *Principles of organ transplantation*, Philadelphia, 1989, Saunders.
- Klintmalm G: A review of FK506: a new immunosuppressive agent for the prevention and rescue of graft rejection, *Transplant Rev* 8:53-63, 1994. Phillips MG, editor: *Organ procurement, preservation and distribution in transplantation*, Richmond, Va., 1993, The William Byrd Press Inc.
- Rossi SJ, Schroeder TJ, Hariharan S, First MR: Prevention and management of the adverse effects associated with immunosuppressive therapy, *Drug Safety* 9:104-131, 1993.
- Schroeder TJ, Pesce AJ, Vine WH, First MR: Cyclosporine monitoring —An update, *American Association for Clinical Chemistry—TDM/Tox* 13:7-22, 1991. Schroeder TJ, First MR: Monoclonal antibodies, *Am J Kidney Dis* 23:138-147, 1994.
- Takemoto S, Terasaki PI, Cecka JM, et al: Survival of nationally shared, HLA-matched kidney transplants from cadaveric donors, *N Engl J Med* 327:834-839, 1992.
- Terasaki PI, Cecka JM, editors: *Clinical transplants* 1993, Los Angeles, 1994, UCLA Tissue Typing Laboratory.
- Yatscoff RW: Laboratory support for transplantation, *Clin Chem* 40:2166-2173, 1994.

Tablas

Tabla 50-1. Trasplantes realizados en los Estados Unidos en 1994

	1994
Riñón	11,104
(DFV)	(2,730)
(Cadáver)	(8,374)
Hígado	3,590
Corazón	2,334
Páncreas	841
Pulmón	703
Cardiopulmonar	70
Total	18,642

Tabla 50-2. Evaluación médica del donante renal vivo potencial



Interrogatorio completo y exploración física

Estudios de laboratorio *

Cuenta completa de sangre

Urea y creatinina sérica, sodio, potasio, cloruro, bicarbonato

Glucosa sanguínea en ayuno (tolerancia a la glucosa si hay antecedentes familiares de diabetes)

Calcio sérico, fósforo, ácido úrico

Pruebas de función hepática incluidas bilirrubina, fosfatasa alcalina, transaminasas

Lípidos en ayuno incluidos colesterol, triglicéridos, lipoproteínas de alta densidad, lipoproteínas de baja densidad

Tiempo de protrombina, tiempo parcial de tromboplastina

Anticuerpos contra citomegalovirus (CMV), virus de Epstein-Barr (EBV), virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), *Treponema pallidum*

Antígeno y anticuerpo de hepatitis B, anticuerpo de hepatitis C

Análisis y microscopía de orina

Cultivo de orina

Orina de 24 horas para creatinina, proteína, calcio, ácido úrico

Electrocardiograma

Estudios de rayos X

Radiografía de tórax

Pielografía intravenosa

Arteriograma renal

* No hay rangos aceptables absolutos para estas pruebas de laboratorio. El objetivo es asegurar que el donante potencial tenga excelente salud general sin contraindicación para la remoción de un riñón y ninguna infección potencial o neoplasias malignas que pueda transmitir al receptor.

Tabla 50-3. Red Unida para Compartir Organos: pruebas de laboratorio obligatorias del potencial donante cadáver

Cuenta de sangre completa

Electrolitos

Gases sanguíneos

Tipificación ABO

Tamizaje para hepatitis

Tamizaje para sífilis (VDRL o RPR)



Tamizaje para los anticuerpos contra:

HIV-1

HTLV-1

Citomegalovirus

Cultivos sangre y orina sí se hospitaliza más de 72 horas

Específico para riñón *

Creatinina y urea séricas

Análisis de orina

Específico para hígado *

Enzimas hepáticas: transaminasas y fosfatasa alcalina

Tiempo de protrombina y tiempo parcial de tromboplastina

Específico de corazón *

Electrocardiograma normal de 12 trazos

Consulta con el cardiólogo

Radiografía de tórax

Específico de páncreas *

Amilasa sérica

Lípasa sérica

Glucosa

* No hay rangos aceptables absolutos para estas pruebas de laboratorio. El objetivo es asegurar que los órganos funcionen después del trasplante y que ninguna infección o neoplasia maligna sean transmitidas del donante al receptor.

Tabla 50-4. Evaluación de Pretrasplantes del receptor renal

Interrogatorio completo y exploración física

Evaluación dental

Evaluación ginecológica

Estudios de laboratorio *

Creatinina sérica, urea, ASAT, ALAT, bilirrubina y fosfatasa alcalina

Antígeno y anticuerpo de hepatitis B, anticuerpo de hepatitis C

Anticuerpos contra CMV, VIH y EBV

Cultivo de orina

Estudios de rayos X

Radiografía de tórax

Series del tracto gastrointestinal superior

Enema con Bario (edad >40 años)

exploración con ultrasonido

Exploración ultrasónica de la vesícula biliar

Cistouretrograma evacuado

Mamografía (mujer >40 años)



* No hay rangos absolutos aceptables para estas pruebas de laboratorio. El objetivo es asegurar que el receptor potencial esté suficientemente motivado para experimentar el procedimiento quirúrgico y para resistir los problemas potenciales de los agentes inmunosupresores.

Tabla 50-5. Escala de clasificación Banff del rechazo de aloinjerto renal agudo *

Clasificaciones	Descripción
Cambios dudosos	Invasión linfocítica leve de los túbulos (tubulitis)
Rechazo agudo leve (grado I)	Infiltrados intersticiales con tubulitis moderada
Rechazo agudo moderado (grado II)	Infiltrados intersticiales con tubulitis severa y/o moderada, arteritis intimal.
Rechazo agudo severo (grado III)	Arteritis severa intimal y/o transmural, cambios de fibrinoides, necrosis celular de músculo liso a menudo con infarto por zonas y hemorragia intersticial
Estandarización internacional de los criterios para el diagnóstico histológico del rechazo de aloinjertos renales desarrollado por un grupo de patólogos renales, nefrólogos y cirujanos de trasplante que se reunieron en Banff, el Canadá, 2-4 de agosto de 1991. * La clasificación histológica puede o no correlacionarse con los índices bioquímicos como la creatinina sérica.	

Tabla 50-6 Clasificación del rechazo de aloinjerto celular hepático agudo *

Grado	Descripción
Consistente con el rechazo	Infiltrado portal linfocítico o mixto con daño mínimo del conducto biliar (<50%) y ninguna endotelialitis
Rechazo leve	Infiltrados portales leves con hipertrofia epitelial biliar y endotelial, y daño
Rechazo moderado	Infiltrado portal linfocítico o mixto con daño significativo del conducto biliar (>50%), con o sin endotelialitis

Rechazo severo	Infiltrados linfocíticos o portales mixtos, arteritis, escasez de conductos biliares, hinchamiento hepatocelular central con deserción confluyente de los hepatocitos
* La clasificación histológica puede o no correlacionar con índices bioquímicos como ASAT, ALAT y bilirrubina.	

Tabla 50-7. Clasificación estándar de biopsias cardiacas de la Sociedad Internacional para Trasplantes de Corazón *

Grado	Descripción
0	Ningún rechazo
1A	Infiltrado focal perivascular o intersticial sin daño de miocitos
1B	Infiltrado difuso pero perivascular disperso y/o intersticial sin daño de miocitos
2	Un foco sólo con infiltración dinámica y/o daño focal de miocitos
3A	Infiltrados multifocales y/o daño de miocitos
3B	Proceso inflamatorio difuso con daño de miocitos
4	Infiltrado polimórfico difuso agresivo ± edema ± hemorragia ± vasculitis con necrosis
*La clasificación histológica no correlaciona con índices bioquímicos como la creatina fosfocinasa y la lactato deshidrogenasa.	

Tabla 50-8. Comparación del rechazo agudo con la nefrotoxicidad de ciclosporina A (CYA)

Parámetro	Rechazo agudo	Nefrotoxicidad de CYA
Clínico		
Aparición	<60 días	Variable
Fiebre >37.°C	+	-
Aumento de peso >0.5 kg	+	
Oliguresis	++	±
Bioquímico		
Creatinina	Ascenso rápido (>3 mg/L/día)	Ascenso gradual (1-2 mg/L/día)
BUN:creatinina	<20:1	>20:1
Potasio (suero)	Aumentado	Aumentado ++
Bicarbonato (suero)	Disminuido +	Disminuido ++



Ácido úrico (suero)	Ningún cambio	Aumentado +
Magnesio (suero)	Ningún cambio	Disminuido +
Sodio (orina)	Disminuido ±	Disminuido ++
Ciclosporina A* nivel directo	Bajo, <150 ng/mL	Alto, >400 ng/mL
Linfocitos (orina)	++	-
Patológico		
Biopsia	Endovasculitis	Arteriopatía
	Tubulitis	Vacuolización tubular y mitocondrial
	Edema intersticial	Edema mínimo
	Glomerulitis	Fibrosis intersticial
	Infiltrados difusos	Infiltrados focales
Pruebas diagnósticas		
Ultrasonografía	Area transversal del injerto aumentada	Área transversal del injerto normal
Imagen de resonancia magnética	Hinchamiento	Normal
Radionucleótidos	Perfusión reducida. Flujo arterial irregular	Función tubular reducida Perfusión normal o reducida
+ Indica una respuesta positiva y - indica falta de respuesta.		
* Sangre entera de TDx, ensayo monoclonal.		

Tabla 50-9. Cambios Relativos en los valores de laboratorio después del trasplante hepático

Condición clínica	Bilirrubina	Fosfatasa alcalina	ASAT	ALAT
Rechazo				
Leve	++	++	+	+
Moderado	++	++	++	++
Severo	+++	+++	+++	+++
Otras condiciones				
Colestasis	++	++	±	±
Necrosis isquémica	++	++	+++	+++
Hepatitis	+	+	++	++
ALAT, Alanina aminotransferasa; ASAT, aspartato aminotransferasa.				

Tabla 50-10. Pruebas dinámicas de función hepática



Prueba	Evaluación funcional	Utilidad
metabolismo de lidocaína / formación de monoetilglicínexilidida	Actividad de Citocromo P-450, flujo sanguíneo hepático	Evaluación del donante potencial y receptor antes del trasplante y evaluación del receptor después del trasplante
Depuración del verde de indocianina	Flujo sanguíneo hepático	Evaluación del receptor potencial antes del trasplante
Eliminación de galactosa	Función hepatocelular a través de la capacidad de saturación enzimática	Evaluación del donante potencial antes del trasplante
Relación acetoacetato/3-hidroxiбутirato (relación de cuerpos cetónicos)	Función de reducción/oxidación, respiración hepatocelular	Evaluación del donante potencial antes del trasplante y del receptor después del trasplante

Tabla 50-11. Protocolos inmunosupresores comunes

Monoterapia
Ciclosporina A
Tacrolimus
Doble terapia
Ciclosporina A + prednisona
Tacrolimus + prednisona
Prednisona + azatioprina
Triple terapia
Ciclosporina A + prednisona + azatioprina
Tacrolimus + prednisona + azatioprina
Cuádruple terapia
Terapia antilinfocítica (OKT3 o ATG) + Ciclosporina A + Prednisona + Azatioprina
Terapia antilinfocítica (OKT3 o ATG) + Tacrolimus + Prednisona + Azatioprina

Tabla 50-12. Interacciones farmacológicas de Ciclosporina A

Niveles reducidos de ciclosporina A	Niveles aumentados de ciclosporina A	Sinergismo nefrotóxico
Carbamazepina	Diltiazem	Aciclovir
Isoniazida	Eritromicina	Aminoglucósidos
Fenobarbital	Fluconazol	Amfotericina B



Fenitoína	Itraconazol	Cotrimoxazol
Rifampicina	Ketoconazol	Furosemida
Nafcilina	Metoclopramida	Ganciclovir
	Metilprednisolona	Antagonistas de H ₂
	Nicardipina	Melfalán
	Verapamil	Agentes anti-inflamatorios no esteroideos
		Vancomicina

Tabla 50-13. (Parte A) Resumen de los parámetros de ensayo para el monitoreo de ciclosporina A

Ensayo	Tipo de anticuerpo, automatizado	Matriz de la muestra, automatizado	Linealidad
³ H Sandoz	Policlonal, No	Plasma	62.5-2000
		Sangre entera	50-1000
HPLC	No aplicable	Sangre entera	50-1000
TDx	Policlonal, Sí	Plasma	10-1000
		Sangre entera	25-2000
INCstar	Policlonal, No	Plasma	
		Sangre entera	50-1000
³ H Sandoz	Monoclonal, No	Plasma	10-500
		Sangre entera	
INCstar	Monoclonal, No	Plasma	
		Sangre entera	50-1000
TDx	Monoclonal, Si	Sangre entera	25-1500
Du Pont	Monoclonal, Sí	Sangre entera	25-350
Syva	Monoclonal, Sí	Sangre entera	50-500

Tabla 50-13 (Parte B) Resumen de los parámetros de ensayo para el monitoreo de ciclosporina A

Ensayo	Matriz de la muestra, automatizado	% de CV	Tiempo de entrega	
			Tiempo estimado	Específico o no específico
³ H Sandoz	Plasma Sangre entera	4-12	8 horas	No específico
HPLC	Sangre entera	7-10	8 horas	Específico



TDx	Plasma	3-4	45 min	No específico	
	Sangre entera	2-6	45 min		
INCstar	Plasma		3 horas	No específico	
	Sangre entera	5-10			
³ H Sandoz	Plasma	3-6	8 horas	Específico o no específico	
	Sangre entera				
INCstar	Plasma			Específico o no específico	
	Sangre entera	5-10	3 horas		
TDx	Sangre entera	5-7	45 min	Específico	
Du Pont	Sangre entera	2-8	30 min	Específico	
Syva	Sangre entera	5-8	120 min	Específico	

Tabla 50-14. Rangos terapéuticos para el ensayo de ciclosporina A con TDx monoclonal en sangre completa en la Universidad de Cincinnati

Trasplantes del riñón y de riñón-páncreas

<6 meses (250-375 ng/mL)

>6 meses (100-250 ng/mL)

Trasplantes hepáticos

≤ 1 mes (350-450 ng/mL)

2-6 meses (250-350 ng/mL)

>6 meses (170-240 ng/mL)

Trasplantes cardiacos

<6 semanas (300-420 ng/mL)

6-12 semanas (180-300 ng/mL)

>12 semanas (120-180 ng/mL)

CAPÍTULO 51

51. Toxicología

Alphonse Poklis

Steven H. Y. Wong

Amadeo J. Pesce

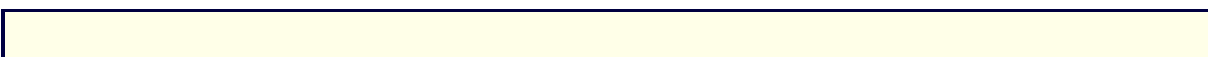
Definiciones

Relaciones de dosis

Mecanismos de toxicidad

Factores que afectan la toxicidad

Naturaleza del agente tóxico



Variables de exposición
Variables biológicas
Farmacología quirral
Toxicocinética
Biotransformación de agentes xenobióticos
Medicamentos y agentes no terapéuticos presentes en el laboratorio clínico
Agentes químicos usados en suicidios
Fármacos utilizados en situaciones de emergencia
Antídotos y tratamiento
Interacciones de fármacos
Aspectos médico-legales
Métodos de análisis
Acetaminofén
Tamizaje de fármacos
Plomo
Salicilatos

OBJETIVOS

- Definir toxicología, agente tóxico, toxicidad y LD50.
- Describir los mecanismos de toxicidad y los factores que influyen en la toxicidad.
- Enumerar algunos efectos generales de agentes tóxicos.
- Enumerar y describir las clases de fármacos que se encuentran frecuentemente en situaciones de sobredosis.
- Definir las interacciones entre fármacos.

Términos clave

agente tóxico o veneno Sustancia que, cuando se toma en cantidad suficiente, causará una enfermedad o la muerte.

agentes xenobióticos Compuestos, a menudo fármacos, que no se producen normalmente en el cuerpo.

analgésicos Clase de fármacos que reducen el dolor.

antidepresivos Clase de fármacos que alivia la depresión.

antidepresivos tricíclicos Fármacos que elevan el estado de ánimo.

antídoto Cualquier agente que contrarresta los efectos de un agente tóxico.

benzodiazepinas Grupo de fármacos sedantes que reducen la ansiedad.

biotransformación Modificaciones químicas que sufren los agentes compuestos a medida que pasan a través del cuerpo.

confirmación El proceso de verificar la identidad de un fármaco o de su(s) metabolito(s) mediante el uso de cuando menos dos diferentes pruebas. La prueba inicial de tamizaje es seguida de una segunda prueba confirmatoria, la cual debe utilizar un principio analítico distinto al usado en la prueba de tamizaje.

dosis letal Cantidad de sustancia que si se ingiere causará la muerte.



- dosis terapéutica** Cantidad de sustancia que producirá el efecto farmacológico deseado.
- enantiómeros** Isómeros estereoquímicos de un compuesto que son capaces de girar la luz polarizada. Se denominan *d* cuando giran la luz en sentido de las manecillas del reloj y *l* cuando el giro es en sentido contrario a las manecillas del reloj. También se denotan como (*R*) y (*S*), respectivamente.
- fármacos de diseño** Análogos de sustancias controladas cuya condición legal aún no ha sido definida por la Agencia de Control de Drogas de los Estados Unidos (DEA).
- fármacos quirales** Fármacos (isómeros estereoquímicos) con cuatro diferentes grupos químicos unidos a un átomo de carbono, que producen estructuras que no se superimponen. (*Quiral* proviene del griego “mano”).
- fenotiazinas** Fármacos usados para tratar las psicosis.
- hipnóticos** Clase de fármacos que se usan frecuentemente como sedantes.
- inhalantes** Agentes químicos volátiles, como el tolueno, que son componentes de productos de uso doméstico pero que pueden ser de fármacos de abuso cuando se inhalan sus vapores, produciendo daño neurológico.
- interacción farmacológica** La diferencia que se observa entre las acciones independientes de dos o más fármacos y sus acciones combinadas cuando son administrados juntos.
- LD₅₀** La cantidad de sustancia que causará la muerte en la mitad de la población de animales de prueba.
- opiáceos** Fármacos con estructuras químicas semejantes a las de la heroína y la morfina. Los opiáceos sintéticos incluyen meperidina, oxycodona y otros.
- oxidasas de función mixta** Grupo de enzimas presente en los microsomas del hígado que adicionan oxígeno a un compuesto.
- sustancias de abuso** Compuestos potencialmente adictivos, como el alcohol, la cocaína y la marihuana que son administrados para inducir sensaciones placenteras. Estos compuestos son a menudo agentes tóxicos.
- tamizaje de fármacos** Prueba que identifica cualitativamente la presencia de uno o más fármacos o clases de fármacos.
- toxicidad aguda** Se refiere usualmente al efecto dañino de un agente tóxico que se manifiesta en segundos, minutos, horas o días después de admitir al paciente.
- toxicidad crónica** Usualmente se refiere a los efectos dañinos a largo plazo causados por un agente, semanas, meses, o años después de afectar inicialmente al paciente.
- toxicocinética** El estudio cuantitativo de la disponibilidad de un agente tóxico en el cuerpo de una persona afectada, en el tiempo. Semejante a la farmacocinética.
- toxicología** El estudio de los agentes tóxicos.
- toxicología forense** Rama de la toxicología que estudia los aspectos médicos y legales de los efectos dañinos de compuestos o agentes tóxicos.

Definiciones

La toxicología es el estudio de los venenos. Más específicamente, la toxicología trata de las propiedades físicas y químicas de los venenos, sus efectos fisiológicos o conductuales en los organismos vivos, los métodos cualitativos y cuantitativos para su análisis en materiales



biológicos y no biológicos, y el desarrollo de procedimientos para el tratamiento de intoxicaciones. Un veneno (o agente tóxico) es considerado como cualquier sustancia que, cuando se toma en cantidad suficiente, causará una enfermedad o la muerte. La frase clave en esta definición es “cantidad suficiente.” Desde el siglo dieciséis el médico Paracelso afirmó a partir de sus observaciones, “Todas las sustancias son venenos; no existe alguna que no sea veneno.” La dosis adecuada a menudo distingue un veneno de un “remedio.” Por ejemplo, cantidades muy pequeñas de cianuro, arsénico, plomo, y diclorodifeniltricloroetano (DDT) son ingeridas regularmente a partir de fuentes alimenticias o inhaladas como contaminantes ambientales y retenidas en el cuerpo humano. Sin embargo, las cantidades de estos agentes tóxicos son insuficientes para causar efectos adversos obvios. Por otra parte, una sustancia tan aparentemente inocua como el agua pura, causará un desequilibrio electrolítico que puede causar incapacidad o incluso la muerte si se ingiere en cantidad suficiente.

A menudo, no existe diferencia entre el mecanismo de acción de un fármaco del de un veneno. Un medicamento es administrado en dosis que alteran la función fisiológica para producir el efecto terapéutico deseado. Si se administra en cantidades mayores a las dosis terapéuticas, un fármaco puede producir efectos tóxicos (dañinos). Así pues, la toxicología es una disciplina cuantitativa que busca identificar la cantidad de una sustancia que, en situaciones particulares de exposición, causará efectos dañinos en un determinado animal o paciente.

Debido a la diversidad de intereses y aplicaciones, la toxicología moderna se ha desarrollado en cinco ramas de especialización: clínica, monitoreo de fármacos terapéuticos, forense, control de sustancias en medicina deportiva, y pruebas ambientales. La toxicología clínica estudia los efectos dañinos de agentes químicos en organismos vivos. El monitoreo terapéutico de fármacos consiste en la utilización racional de terapia química para grupos seleccionados de fármacos, mediante su seguimiento con pruebas de laboratorio de acuerdo a los principios toxicocinéticos clínicos. La toxicología forense es la rama de la toxicología involucrada con los aspectos médicos y legales de los efectos nocivos de agentes químicos o venenos. Dentro del área especializada de pruebas forenses de fármacos urinarios, se realizan análisis de drogas previos a la contratación para un empleo o por sospecha, a fin de disuadir del uso de drogas ilícitas. La toxicología de la medicina deportiva es una especialidad establecida recientemente que trata los efectos nocivos de las drogas que incrementan el desempeño físico, como los esteroides anabólicos y estimulantes como las anfetaminas y la cafeína. La toxicología ambiental se enfoca principalmente en los efectos adversos a la salud de agentes químicos cuya exposición es incidental debido a su ubicuidad en la atmósfera, cadena alimenticia, o en ambientes recreativos u ocupacionales.

Relaciones de Dosis

Toxicidad es un término relativo que se usa para comparar una sustancia con otra. Afirmar que una sustancia es más tóxica que otra es hacer una comparación cuantitativa en términos de la dosis. Esta comparación es válida únicamente en un organismo específico bajo condiciones idénticas de exposición. En la Tabla 51-1 se presenta una escala de la dosis letal de una sustancia para un hombre normal (70 Kg de peso corporal ó 150 libras). En el



lenguaje ordinario, sustancia tóxica se refiere a sustancias con una toxicidad definida in la Tabla 51-1 como “extremadamente tóxica” o “super tóxica” (arsénico, cianuro, estriknina).

Los parámetros importantes en toxicología incluyen la cantidad de un agente introducido en una persona (esto es, una dosis), la ruta de administración, el número de dosis, y el período en el cual el agente es administrado. El tiempo es una medida esencial, ya que el efecto de una gran cantidad de agentes es dependiente del tiempo. Términos tales como *toxicidad aguda* y *toxicidad crónica* son utilizados por conveniencia. En cierta medida, estos términos se traslapan. En general, las reacciones tóxicas observadas en las salas de emergencia son causadas por ingestión aguda, inhalación o inyección de algún agente, mientras que las reacciones causadas por agentes tóxicos ambientales se observan mas frecuentemente en instalaciones de atención médica crónica. De esta manera, los agentes tóxicos pueden tener un efecto agudo cuando la acción del compuesto se observa en cuestión de segundos a días después de la dosificación, o un efecto crónico cuando el esquema temporal es de semanas, años o décadas.

Una relación dosis-respuesta ocurre cuando se observa un incremento en el efecto tóxico a medida que se incrementa la dosis. Sin embargo el incremento en el efecto tóxico puede no ser observado en todas las personas a la misma dosis. Solamente una parte de la población puede ser afectada a una dosis dada, pero a medida que aumenta la cantidad del agente tóxico, ésta resulta lo suficientemente alta como para que la población entera sea afectada.

La Fig. 51-1 muestra la sobreposición entre los efectos terapéutico y tóxico en una población. El eje horizontal (en escala logarítmica) representa una dosis del agente que va de 1 a 10 U, en tanto que el eje vertical muestra el porcentaje acumulativo de individuos tratados que manifiestan una respuesta, esto es, el porcentaje total de la población que es afectada. La curva denominada *efecto terapéutico* se aplica al efecto del agente químico designado, como lo es la prevención de convulsiones en el caso de fenitoína. El punto en la curva en el cual el 50% de los sujetos son tratados eficazmente es el ED_{50} . La curva de *efecto tóxico* describe un efecto no deseado, como náusea, mareo, o en casos extremos la muerte. Es importante remarcar que en este ejemplo, y ciertamente en muchos casos, los rangos de dosis terapéutica y tóxica se superimponen. En algunos individuos se requiere una dosis alta para su tratamiento, mientras que en otros casos esta misma dosis puede producir un efecto tóxico. Por consiguiente, el rango terapéutico normalmente describe el rango de dosis en que ocurre el efecto deseado. Sin embargo, en este rango unos cuantos pacientes no obtendrán beneficio del medicamento, mientras que otros tendrán una reacción tóxica. Las razones de tal variabilidad en la respuesta individual son muchas, la cuales incluyen edad, sexo, raza, condición de salud, y factores genéticos. Todas contribuyen a la distribución del efecto de un agente en una población.

Un parámetro cuantitativo importante usado en toxicología es la dosis necesaria para causar la muerte en un animal. Si se administran dosis crecientes, también un porcentaje creciente de animales morirá. La dosis letal para el 50% de la población, denominada LD_{50} , es un valor importante que se emplea para varios medicamentos o agentes químicos. La Tabla 51-2 muestra la LD_{50} de un número seleccionado de medicamentos y agentes químicos.[ref\(2000\)](#) En humanos, dichos valores son extrapolados de sobrevivientes o de muertes reportadas en la literatura. El agente químico no tiene que afectar a la población completa. Si únicamente 1%



de los animales murieron a una dosis dada, el término viene a ser la $LD_{1\%}$, la dosis letal para 1% de los animales. Si murieron el 99%, el término sería entonces $LD_{99\%}$.

Mecanismos de Toxicidad

Hay una diversidad de formas en que los agentes tóxicos pueden causar sus efectos. Estos pueden ser leves, como los de las moléculas promotoras que ejercen su efecto en las células solamente cuando se ha administrado un carcinógeno, o drásticos, como los causados por un agente cáustico, que destruyen el tejido al entrar en contacto con éste. Los ejemplos enumerados en el cuadro siguiente **pág. 1020** ilustran solamente algunas de las formas en que actúan los agentes tóxicos.

Factores que Afectan la Toxicidad

Naturaleza del agente tóxico

Propiedades de solubilidad.

Una de las propiedades más importantes de un agente tóxico es su solubilidad en varios tejidos del cuerpo. Por ejemplo, los compuestos solubles en agua difícilmente penetran la piel. Aquellos que son solubles en lípidos tienden a ser más fácilmente absorbidos; sin embargo la forma iónica del compuesto y su tamaño molecular son también propiedades importantes que afectan la solubilidad.

Propiedades físicas.

Otra propiedad importante de un agente tóxico es el estado físico, ya sea gas, líquido o sólido. Los gases son fácilmente inhalados y pasan inmediatamente al torrente sanguíneo. También pasan a través de la piel. En contraste, los líquidos no se inhalan a menos que se encuentren en fase de vapor o como aerosoles. Los líquidos, no obstante, pasan a través de la barrera epidérmica. Aunque las partículas pueden ser inhaladas, no se absorben rápidamente a través de la piel. Los sólidos normalmente tienen que ser ingeridos o disueltos antes de presentar un efecto. Los compuestos (tales como el mercurio) con una forma líquida que posee una fase gaseosa importante en las condiciones de la exposición, pueden tener una cantidad adecuada del compuesto en la fase gaseosa para inducir toxicidad por inhalación del vapor.

Variables de exposición

Dependencia de la dosis.

Para los agentes farmacológicos o medicamentos comunes, un incremento en la dosis produce un aumento en el porcentaje de la población que será afectada, así como también un incremento en la severidad de la reacción toxicológica. En contraste, una exposición continua a muy bajas concentraciones puede ser no acumulativa y relativamente inocua. Este efecto de la concentración se observa con el medicamento acetaminofén. En bajas concentraciones este analgésico se usa comúnmente para tratar el dolor y es metabolizado en el hígado a formas no tóxicas mediante una vía que involucra glutatión. En altas concentraciones de acetaminofén, esta vía está deprivada de glutatión, y se produce un daño mediante la generación de radicales libres. Esto puede afectar irreversiblemente el tejido hepático, causando la muerte celular.



Es importante tener en mente que los síntomas de una respuesta toxicológica pueden no estar relacionados de una manera obvia a la respuesta clínica esperada del fármaco. En el caso de antidepresivos tricíclicos, el efecto deseado es una elevación en el ánimo producida por la acción del medicamento sobre los receptores del sistema nervioso central. Cuando el agente terapéutico está presente en una sobredosis, puede afectar receptores semejantes en el corazón, causando arritmias. A medida que la concentración del antidepresivo aumenta, las arritmias también y pueden provocar una falla cardíaca y la muerte.

Ruta, velocidad, y sitio de administración.

La ruta de administración puede ser percutánea, por inhalación, oral, rectal, subcutánea o intravenosa. De todas estas rutas, la percutánea no se considera común en un ambiente hospitalario ya que la mayoría de fármacos se administra por otras rutas. Sin embargo, la piel tiene una gran superficie y es permeable a varios agentes químicos. Una gran cantidad de nuevos sistemas para administrar medicamentos usando membranas transcutáneas o *parches*, han originado sobredosis cuando al realizarse incorrectamente la formulación de liberación lenta, el fármaco es liberado de manera rápida.

Puede haber una gran variación en las cantidades de un compuesto necesarias para causar la muerte basado en la vía de administración. Por ejemplo, se ha demostrado una diferencia de veinte veces entre el efecto de procainamida aplicada intravenosamente contra la administración subcutánea. Para otros compuestos como pentobarbital, hay una diferencia en dosis de menos del doble entre estas dos vías para alcanzar el mismo efecto letal. De esta manera, la ruta de administración puede producir una diferencia considerable en la curva dosis-respuesta a un agente tóxico.

Duración y frecuencia de la exposición.

La duración de la exposición es el tiempo en segundos, minutos, horas, días, meses, o años que una persona está expuesta a un agente tóxico. Para algunos agentes, como el monóxido de carbono, la duración puede ser de unos cuantos segundos o minutos, como es el caso de una exposición intramuros a una alta concentración de monóxido de carbono, o crónica, como hábito del tabaquismo. Una medición que se usa frecuentemente es *tiempo de exposición* \times *dosis*. El valor obtenido se usa para comparar individuos con diferentes cantidades del agente tóxico, como los niveles sanguíneos de plomo en trabajadores y los síntomas toxicológicos, como en la enfermedad renal. La exposición frecuente conlleva en muchos casos la acumulación de efectos tóxicos, pero estos variarán dependiendo del agente tóxico. Un caso poco común es la reacción de hipersensibilidad retrasada, en la que una cantidad muy pequeña de la sustancia puede desencadenar una reacción anafiláctica, aún cuando dicha cantidad no produzca efectos tóxicos en la misma persona en condiciones de presensibilización.

Variables biológicas

La edad afecta la tasa metabólica de los compuestos. En general, los sujetos más jóvenes metabolizarán un fármaco más rápidamente que los más viejos. A menudo los pacientes de mayor edad reciben la misma dosis que los pacientes jóvenes; sin embargo, en virtud de que la velocidad de su metabolismo puede ser la mitad o una tercera parte de la de



los pacientes jóvenes, el fármaco se puede acumular hasta alcanzar niveles tóxicos. Parte de la diferencia por la edad se atribuye a cambios en la función de los órganos. Por ejemplo, la depuración renal de una población de edad avanzada es de 20% a 50% el nivel de la de jóvenes estudiantes de tecnología médica.

La diferencia en la constitución genética puede ser uno de los factores que mayormente afectan los efectos tóxicos de una sustancia. La succinilcolina, un relajante muscular, se hidroliza a ácido succínico y colina. Sin embargo, ciertas personas (1 en 3000) no tienen la enzima que hidroliza el compuesto o tienen una forma defectuosa de la enzima. Por lo tanto, estos individuos presentan una relajación muscular prolongada y posible apnea (interrupción respiratoria) y por lo tanto están en riesgo cuando reciben este medicamento. Es posible realizar el tamizaje de una población para esta deficiencia mediante la determinación de los niveles de acetilcolinesterasa en presencia del inhibidor dibucaína, y de esta manera encontrar aquellas personas con esta deficiencia enzimática.

Otro ejemplo de diferencias genéticas en el metabolismo de fármacos involucra la capacidad de N-acetilación de ciertos compuestos. Un medicamento, la procainamida, es acetilada como parte del proceso normal de detoxificación. Se ha encontrado que hay dos grupos de personas, aquellas que son acetiladores rápidos y los acetiladores lentos. Esto puede ser caracterizado por una distribución bimodal (ver capítulo 19). Los acetiladores lentos, que forman *N*-acetil procainamida a una velocidad menor, son más susceptibles de tener una reacción inmunológica al compuesto. Sin embargo, el fármaco *N*-acetilado es depurado más lentamente, generando entonces niveles sanguíneos mayores en los acetiladores rápidos a la misma dosis. Los niveles del fármaco son dependientes de la velocidad de *N*-acetilación.

Farmacología quiral

Los enantiómeros de fármacos son compuestos quirales con cuatro grupos diferentes unidos a un átomo de carbon, capaz de girar la luz polarizada a la derecha o izquierda, y son designados como *d* o (+), y *l* o (-) respectivamente.[refs\(2001\)](#) Las propiedades de los enantiómeros pueden variar desde ser idénticas hasta tener diferentes grados de eficacia o toxicidad. A fin de ilustrar las diferencias en toxicología, la (*S*)- (+)-metanfetamina tiene un potencial considerable como fármaco de abuso mientras que la (*R*)-(-) -metanfetamina es usada como un descongestionante nasal. Estos enantiómeros pueden distinguirse entre sí mediante un inmunoensayo estereoespecífico en orina.

Toxicocinética.



Los principios de toxicocinética son semejantes a los de farmacocinética discutidos en el capítulo 56 sobre monitoreo de fármacos terapéuticos. La mayoría de agentes tóxicos, como los gases o drogas, tienen que pasar a través de la membranas o ser absorbidos y después pasar a través de la circulación antes de ejercer sus efectos en un tejido blanco particular. Consecuentemente, los primeros pasos de liberación y absorción pueden ser muy diferentes cuando ocurren sobredosis. Además, varios agentes tóxicos pueden ser transformados por procesos metabólicos antes que ejerzan su acción en receptores o en células. Finalmente, la mayoría de fármacos o compuestos debe metabolizarse antes de excretarse. En general, es posible utilizar las mismas ecuaciones presentadas para monitoreo terapéutico a fin de rastrear estos agentes. Sin embargo, en situaciones de sobredosis, como con fenitoína, el patrón de eliminación puede cambiar de primer orden a orden cero a medida que las vías de eliminación se saturan. Otros compuestos, como los agentes cáusticos (álcalis, ácidos, corrosivos), tienen un efecto dañino directo y por lo tanto no se pueden estudiar de esta manera.

Biotransformación de agentes xenobióticos

La mayoría de las sustancias o agentes que entran en el cuerpo (xenobióticos) sufren un cambio en estructura llamado *biotransformación*. Existen numerosas vías para que esto ocurra. En el recuadro se presenta una lista de dichas reacciones. Las moléculas biotransformadas tienen propiedades que las hacen biológicamente menos activas, más activas, o igual de reactivas que el compuesto original. La Atropina se hidroliza para dar origen a los compuestos inactivos ácido trópico y tropina. Por otra parte, la ciclofosfamida, un agente alquilante anticancerígeno, tiene que ser activada por los microsomas hepáticos para ser eficaz. Finalmente, el medicamento amitriptilina es desmetilado para formar nortriptilina, la cual tiene la misma potencia que un antidepresivo tricíclico.

Los microsomas hepáticos contienen un grupo de enzimas que oxidan una amplia gama de compuestos como esteroides, ácidos grasos, medicamentos, plaguicidas y carcinógenos. Estos sistemas microsomales son denominados *oxidasas de función mixta*. La última oxidasa en esta cadena es el citocromo P-450, llamado así debido a su absorción en el espectro a 450 nm. Recientemente, la superfamilia P-450 (CYP) ha sido caracterizada, consistiendo de 16 genes en el hombre.[ref\(2002\)](#) La oxidación de un fármaco se lleva a cabo a través de una reacción que comprende oxígeno, el fármaco o sustrato y la enzima del citocromo P-450 apropiada:

Citocromo P-450



Varias de las reacciones de biotransformación antes enumeradas son reacciones catalizadas por la superfamilia del citocromo microsomal *CYP*; éstas incluyen epoxidaciones, hidroxilaciones de aril y alquil hidrocarburos, oxidación de alcoholes, remoción del grupo alquilo de los enlaces tipo éter, *N*-hidroxilación, nitroxidación, *N*-desalquilaciones, desaminación oxidativa, sulfoxidación, y deshalogenación. Por ejemplo, la subfamilia de *CYP2D6* cataliza la hidroxilación de debrisoquin y amitriptilina. Estas reacciones enzimáticas son inducidas por algunos fármacos como fenobarbital o alcohol, y son inhibidas por otros como cimetidina. De esta manera, la administración de uno de estos fármacos cambiará la



velocidad del metabolismo y modificará sustancialmente el nivel basal del compuesto. En general, los fármacos oxidados por el sistema de enzimas microsomales son liposolubles. Después de la oxidación, éstos son más hidrosolubles y por lo tanto tienen mayor probabilidad de ser excretados. El sistema P-450 está bajo control genético, y la variación en la capacidad para metabolizar compuestos se atribuye a estas diferencias genéticas de los sistemas P-450.

Reacciones de biotransformación de agentes xenobióticos*

Azorreducción (azobenceno anilina)
Nitrorreducción (nitrobenceno anilina)
Hidrólisis de ésteres (procaína 2-dietilaminoetanol y ácido *p*-aminobenzóico)
Acilación (procainamida *N*-acetilprocainamida)
Conjugación con ácido glucorónico (morfina glucoronidato de morfina)
Conjugación con ácido mercáptico (diclorobenceno ácido mercáptico de diclorobenceno)
Desaminación oxidativa (anfetamina fenilacetona)
Desalquilación (meperidina normeperidina)
Oxidación de anillos aromáticos (*n*-butilanilina *n*-butil-*p*-aminofenol)
N-oxidación (trimetilamina óxido de trimetilamina)
S-oxidación (clorpromazina sulfóxido de clorpromazina)
Oxidación de alcoholes (alcohol benzílico ácido benzóico)
Hidroxilación de cadenas laterales de alquilo (*p*-nitrotolueno *p*-nitrobencil alcohol)

* Ejemplos de cada reacción aparecen en paréntesis

Fármacos y Agentes No Terapéuticos que se Encuentran en el Laboratorio Clínico

Una función del laboratorio de toxicología clínica es ayudar al profesional médico a determinar si la condición patológica de un paciente es causada por un agente tóxico. A pesar de que muchas muertes son debidas a intoxicaciones, un número aún mayor de individuos ingresan al hospital con diagnóstico de intoxicación potencial. El médico debe diferenciar entre una condición que es resultado de una intoxicación y una que no lo es. Los avances recientes en metodologías de inmunoensayo proporcionan evaluaciones rápidas de acuerdo al nivel de cuidado requerido para un número determinado de agentes terapéuticos y drogas ilícitas como cocaína, cannabinoides, fenciclidina, anfetaminas, barbituratos y benzodiazepinas. Estas pruebas rápidas de tamizaje permiten mejorar el manejo de los pacientes.

Agentes químicos usados en suicidios

La Tabla 51-3 muestra el número de muertes por intoxicación en 1991 por tipo de



agente químico.[ref\(2003\)](#) La mayoría de estas muertes son debidas a suicidios y el resto son resultado de intoxicación accidental. Es importante señalar que la mayoría de intoxicaciones son causadas por agentes que son fácilmente accesibles, como los medicamentos que no requieren receta médica o los que se prescriben con propósitos medicinales. Estos fármacos incluyen analgésicos, tranquilizantes, agentes psicotrópicos, barbituratos y otros. El problema más común que enfrenta el laboratorio es la determinación del agente empleado en un intento de suicidio. Cuando los individuos que sufren depresión tienen acceso a agentes letales potenciales, frecuentemente intentan suicidarse con estos agentes.

Fármacos en situaciones de emergencia

En los hospitales, particularmente en aquellos involucrados en atención de emergencias, el patrón de ingestión o abuso de drogas tóxicas en pacientes que presentan crisis agudas es algo diferente al que se observa en casos de suicidio. En la Tabla 51-4 se enumeran los casos que muestran la presencia de una droga en particular.[ref\(2004\)](#) Nótese que las drogas o clases de drogas más importantes observadas fueron cocaína, etanol, acetaminofén, cannabinoides, antidepresivos y benzodiazepinas. De nuevo, los fármacos que requieren receta médica representan una fracción importante de los agentes tóxicos observados. Una observación aún más importante es que un número considerable de pacientes ingieren más de un medicamento. En un estudio, se encontró que alrededor de la mitad de los pacientes admitidos en el servicio de emergencia habían ingerido dos o más fármacos.[ref\(2005\)](#) Las pruebas de tamizaje de fármacos son solicitadas para una variedad de pacientes en situaciones de emergencia que parecen clínicamente hiperactivos, con alucinaciones, o en estado de coma. Una descripción de los diferentes grados de coma en casos tóxicos es proporcionada por Hanenson a continuación:[ref\(2006\)](#)

Clasificación comatosa

Grado 1 - Somnoliento pero responde a órdenes verbales

Grado 2 - Inconsciente pero responde a estímulos dolorosos de baja intensidad

Grado 3 - Inconsciente pero responde solamente a estímulos dolorosos de alta intensidad

Grado 4 - Inconsciente sin responder a estímulo doloroso

Cuando un paciente comatoso o que actúa de manera extraña es atendido en la sala de emergencia, uno de los diagnósticos que debe considerar el médico es la posibilidad de una sobredosis por fármacos. Es importante para el médico que trate de establecer la naturaleza o identidad del fármaco o fármacos utilizados, a fin de hacer un uso más eficiente de las instalaciones del laboratorio. El juicio del médico respecto a la presencia de fármacos intoxicantes o letales se basa en varias observaciones clínicas (Tabla 51-5). La historia obtenida de un paciente en estado alerta puede ser útil, aunque en general la historia de un paciente no es un índice confiable para conocer que clase de fármacos pudo haber tomado (menos del 50% de confiabilidad).



Los efectos generales de agentes tóxicos incluyen síntomas como depresión respiratoria, conmoción, convulsiones, hipertermia o hipotermia. Algunos efectos clínicos y síntomas observados en pacientes intoxicados con dosis muy altas de estos agentes se resumen en la Tabla 51-5. El tamaño de las pupilas, la frecuencia respiratoria, el estado cardíaco, y la condición de otros sistemas son todos signos importantes y pueden proporcionar información sobre la naturaleza de la sustancia tóxica. Un enfoque alternativo es establecer el toxídrome (síndromes tóxicos). En virtud de que los fármacos de abuso y agentes tóxicos causan disfunción autónoma acompañada de signos físicos, los toxídromes son enlistados en la Tabla 51-5. [ref\(2007\)](#)

Cuando el médico sospecha de uno o más fármacos, se pueden ordenar pruebas de laboratorio para confirmar su presencia y para determinar la cantidad presente. Estos datos pueden determinar la terapia a utilizar. Si el médico no tiene la certeza de la presencia de fármacos, se puede ordenar un tamizaje general para fármacos. El tamizaje probará rápidamente la presencia de algunos de los grupos mayores de fármacos; los resultados positivos deben confirmarse mediante procedimientos alternativos (ver pág. 1026). Se pueden ordenar pruebas de electrolitos, BUN, y glucosa a fin de descartar padecimientos renales o diabetes.

Antídotos y Tratamiento

La historia de los venenos está entrelazada con la de los antídotos. Actualmente existen solamente unos cuantos antídotos específicos para aquellos agentes que comúnmente se encuentran en el ambiente hospitalario. Estos se presentan en la Tabla 51-7. Usualmente se aplican terapias de apoyo en la mayoría de los casos, que incluyen tratamiento para depresión respiratoria, aspiración, conmoción, convulsiones, delirio, methemoglobinemia, hipertermia e hipotermia. La terapia de apoyo se emplea para mantener las funciones vitales del paciente hasta que la el fármaco es depurado del organismo.

La remoción del agente tóxico se puede efectuar a menudo por emesis (vómito), lavado gástrico, o descontaminación dérmica. Otras formas de tratamiento incluyen agentes que facilitan la erradicación del compuesto del cuerpo. Para tratar la intoxicación por mercurio y arsénico se emplea dimercaprol y las sales de los metales divalentes (plomo, mercurio, cobre, níquel, zinc, cadmio, cobalto, berilio y manganeso) son acomplejados con etililéndiaminotetracetato (EDTA). El compuesto deferoxamina se usa para eliminar las cantidades en exceso de hierro y aluminio. Se puede administrar carbón activado por ingestión o por deposición en el estómago para aumentar la velocidad de eliminación del agente tóxico del cuerpo. En el caso de intoxicación infantil por plomo, los Centros para el Control de Enfermedades de los Estados Unidos (conocidos bajo la abreviatura inglesa CDC por “Centers for Disease Control”) han diseñado protocolos específicos que utilizan BAL (British anti-Lewisita), EDTA, y succimer.

Varios agentes tóxicos son removidos más rápidamente si se incrementa el flujo de orina (diuresis forzada). Esto se efectúa a menudo mediante la administración intravenosa de un diurético como manitol. Además, se reduce el potencial nefrotóxico de algunos agentes (como cisplatino) debido a que su concentración es disminuida en condiciones diuréticas. El



pH de la orina también es importante. Para los fármacos básicos como las anfetaminas, la excreción se incrementa cuando la orina es ácida. La excreción de barbituratos es aumentada por la orina alcalina, donde la molécula está ionizada y por lo tanto es más soluble.

Interacción de Fármacos

Cuando se administran dos fármacos a un paciente, puede ocurrir que sus acciones no sean independientes; esto es, un agente puede afectar la acción farmacológica del otro. Este fenómeno es denominado *interacción de fármacos*. Los efectos de dichas interacciones no son obvios y se ha reunido considerable información al respecto a partir de reportes de casos. Se han determinado varias interacciones y no es posible proporcionar una lista completa aquí. Los tipos de interacciones han sido compilados por Stockley, [ref\(2008\)](#) aunque él señala que “las interacciones que ocurren cuando los fármacos son administrados concurrentemente, a menudo no son resultantes de un solo mecanismo sino de dos o más mecanismos que actúan concertadamente....@ La Tabla 51-8 muestra una lista con un ejemplo de cada tipo de interacción.

Se han observado importantes interacciones farmacológicas entre el etanol y otros agentes que afectan el sistema nervioso central. El etanol se encuentra comúnmente en las interacciones de fármacos debido a su amplio uso y también porque tiene un extenso rango de efectos depresivos en el sistema nervioso central. Por ejemplo, el uso concomitante de barbituratos y alcohol puede tener efectos dañinos. La dosis letal de barbituratos es casi 50% menor cuando éstos se combinan con alcohol. Este mismo efecto ocurre con el uso simultáneo de agentes como el hidrato de cloral, paraldehído, glutetimida, meprobamato y otros tranquilizantes.

Aspectos Médico Legales

Los profesionales de laboratorio de toxicología pueden llegar a involucrarse en el sistema médico-legal debido a su necesidad de documentar bajo juramento la validez de los resultados analíticos. Estos tecnólogos también deben documentar los procedimientos del laboratorio y producir un documento, la cadena de custodia (ver capítulo 3), para asegurar que el espécimen no sea alterado. En algunos tipos de pruebas, como la detección de algunas drogas de abuso, los métodos de tamizaje por inmunoensayo y confirmación por cromatografía de gases o espectrometría de masas pueden estar especificados por una agencia federal como el Servicio de Administración de Substancias de Abuso de Salud Mental (SAMHSA) (antiguamente llamado Instituto Nacional de Drogas de Abuso). Las pruebas actuales para sustancias de abuso (alcohol, marihuana, cocaína, heroína, anfetaminas, fenciclidina) se basan en la presunción de que el uso de ciertas drogas, particularmente cocaína y marihuana, puede ser ilegal y deteriorar el desempeño de los individuos, afectando su trabajo, o dando origen a accidentes. En cualquier caso, esto puede conducir a un litigio que involucre un juicio civil o criminal. La función del laboratorio es proporcionar y documentar datos legalmente admisibles y defendibles.



Métodos de Análisis

Acetaminofén

HELEN M. DODDS

JULIA M. POTTER

Principios del análisis.

Se han descrito una variedad de métodos cromatográficos y espectrofotométricos para determinar cualitativa y cuantitativamente el acetaminofén. La prueba cualitativa más común para la detección de acetaminofén en orina es “la prueba de la mancha” (Tabla 51-9, método 1). Este método simple y económico se basa en la reacción de los metabolitos conjugados de acetaminofén con *o*-cresol en hidróxido de amonio para producir un color azul índigo (azul de indofenol). La prueba de la mancha tiene buena sensibilidad; un resultado positivo se puede obtener en una muestra de orina colectada 24 horas después de la ingestión de 1 g de acetaminofén. Se pueden obtener falsos positivos de la prueba de la mancha en pacientes que han tomado *p*-aminofenol debido a que ambos, acetaminofén y *p*-aminofenol se metabolizan a fenacetín, que da un resultado positivo a la prueba.

Otro método cualitativo para la detección de acetaminofén, es por cromatografía de capa fina en sílica gel (ver capítulo 5 para una descripción de los principios de cromatografía de capa fina).

El análisis cuantitativo de acetaminofén se basaba originalmente en métodos espectrofotométricos pero ha sido reemplazado en gran parte por procedimientos de inmunoensayo. Los métodos espectrofotométricos originales consumían mucho tiempo. El método modificado de Glynn y Kendal^{ref(2009)} (Tabla 51-9, método 2) posee una sensibilidad adecuada y no se han reportado interferencias. En este procedimiento, el plasma se desproteiniza con ácido tricloroacético y luego se centrifuga. Después se mezcla una alícuota del sobrenadante libre de proteína con ácido clorhídrico 6M y nitrito de sodio para formar un derivado de ácido nitroso. En el paso final del ensayo se agrega ácido sulfámico seguido de la adición de hidróxido de sodio, obteniéndose un color amarillo que se lee a 430 nm.

También se han empleado procedimientos de cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC) para el análisis de acetaminofén. Los enfoques empleados incluyen la purificación del compuesto de interés utilizando intercambio catiónico y absorción en sílica. Se ha sugerido la cromatografía de líquidos de alta eficacia en fase inversa como un posible método de referencia para cuantificar acetaminofén (Tabla 51-9, método 3).^{ref(2010)}

Los métodos más populares que se usan actualmente para medir acetaminofén son inmunoensayos. Un procedimiento de inmunoensayo frecuentemente usado (Syva Co., Palo Alto, CA 94303) emplea una técnica inmunoenzimática homogénea (TIAE) (Tabla 51-9, método 4). En este procedimiento, el acetaminofén en la muestra del paciente compete con acetaminofén marcado con glucosa-6- fosfato deshidrogenasa para unirse al anticuerpo dirigido contra el acetaminofén. La unión del anticuerpo con el acetaminofén marcado enzimáticamente produce inhibición de la actividad enzimática. Así pues, en los casos donde altas concentraciones de acetaminofén están presente en la muestra del paciente, se unirá



menos del acetaminofén marcado con la enzima produciendo mayor actividad enzimática. El NADH generado por la acción enzimática se monitorea espectrofotométricamente a 340 nm.

Otro procedimiento común por inmunoensayo para el análisis de acetaminofén utiliza el principio de polarización de la fluorescencia (Tabla 51-9, método 5). Este ensayo se basa en la unión competitiva entre el acetaminofén de la muestra del paciente y acetaminofén marcado con fluoresceína por una cantidad limitada de anticuerpo. Los especímenes que contienen altas concentraciones de acetaminofén experimentarán una reducción en la emisión de luz fluorescente polarizada debido a que se unen al anticuerpo pocos complejos acetaminofén-fluoresceína. Cuando hay una cantidad pequeña o nada de acetaminofén en la muestra del paciente, una mayor cantidad de acetaminofén-fluoresceína permanece unido al anticuerpo y entonces hay una mayor emisión de luz fluorescente polarizada.

Especimen.

Puede utilizarse suero o plasma en procedimientos cuantitativos. Para la prueba de la mancha, el espécimen utilizado es orina.

Rango terapéutico.

La concentración terapéutica de acetaminofén en plasma o suero es de 10 a 20 $\mu\text{g/mL}$ (66 a 132 $\mu\text{mol/mL}$). En casos de ingestión tóxica de acetaminofén, una concentración mayor de 200 $\mu\text{g/mL}$ 4 horas después de la ingestión o una vida media mayor de 4 horas del fármaco, es indicador de un daño severo potencial al hígado por radicales libres y otros metabolitos tóxicos resultantes del metabolismo hepático de acetaminofén. El tratamiento con *N*-acetil cisteína (Mucomyst) puede proporcionar protección en estas situaciones. Este tratamiento ayuda a restituir el glutatión, el cual es utilizado por el hígado durante el metabolismo de acetaminofén y previene la producción de radicales libre. La Figura 51-2 muestra un nomograma desarrollado para estimar la severidad del daño hepático como una función de las concentraciones de acetaminofén en plasma a diferentes tiempos después de la ingestión.

Tamizaje de drogas

F. MICHAEL HASSAN

Principios de análisis.

El análisis expedito de drogas de abuso en orina es importante para la detección de sobredosis aguda de drogas. El análisis de drogas se usa actualmente en el tamizaje previo a la contratación en un empleo, para verificar el cumplimiento de pacientes que participan en programas de rehabilitación de drogas, y en la investigación de lesiones relacionadas con accidentes.

En el examen de drogas de abuso se emplea un enfoque jerarquizado de dos niveles, que involucra comúnmente pruebas de tamizaje y pruebas de confirmación. Las muestras que dan un resultado positivo a la prueba usando un procedimiento de tamizaje pueden ser objeto de un análisis más detallado mediante el uso de un método diferente al que se usó originalmente, a fin de confirmar la presencia de la droga de interés. Idealmente, los procedimientos de tamizaje deben ser simples, rápidos, económicos, y tener la capacidad de automatizarse.^{ref(2011)} Se pueden realizar procedimientos de tamizaje para la detección de una droga o clase de drogas en particular, o pueden incluir el análisis del número de drogas que



sea factible técnica y económicamente. Cuando el tamizaje se realiza específicamente para una droga, la prueba que se usa debe garantizar especificidad y sensibilidad adecuadas para lograr una identificación inequívoca del compuesto de interés. Cuando el tamizaje de drogas comprende un análisis integral de un gran número de compuestos, se pueden emplear métodos menos específicos capaces de detectar varios compuestos diferentes.

Característicamente, seis o siete diferentes clases de drogas son analizadas en un tamizaje limitado. Los compuestos que usualmente son tamizados, que han sido enumerados por el Departamento de Salud y Servicios Humanos para el examen de drogas en el sitio de trabajo, incluyen metabolitos de cocaína, benzoilecgonina, opiáceos, anfetaminas, tetrahidrocanabinol y fenciclidina.[ref\(2012\)](#) Otras clases de drogas que también comprenden varios procedimientos de tamizaje integrales incluyen barbituratos y benzodiazepinas.

Los métodos para el análisis de drogas de abuso se pueden dividir en varias categorías, en base a los procedimientos analíticos generales empleados. Las principales categorías incluyen pruebas de la mancha, procedimientos basados en inmunoensayos, y procedimientos cromatográficos. Los métodos más simples y rápidos que se usan para el tamizaje de drogas son las pruebas de la mancha. Estas pruebas se pueden usar para la detección de una droga específica, como acetaminofén o salicilato, o para una clase de drogas como las fenotiazinas. Las pruebas de la mancha usualmente no requieren generalmente de algún tipo de pretratamiento del especimen; la orina o suero sin procesar se adicionan directamente al reactivo de prueba. La presencia de la droga (o drogas) de interés se manifiesta por la formación de un producto de reacción colorido.

En la Tabla 51-10 se muestran las pruebas de mancha comúnmente usadas en los laboratorios. Aunque las pruebas de mancha ofrecen la ventajas de simplicidad y rapidez de procesamiento, varias carecen de especificidad en la medición para la cual la prueba está diseñada. Además, debido a que la formación de un complejo colorido por la presencia de la droga se determina visualmente, la interpretación de las pruebas de la mancha puede ser subjetiva, especialmente cuando el cambio de color que se presenta es muy débil.

El desarrollo y automatización de procedimientos basados en inmunoensayos han venido a ser los métodos más ampliamente usados para la detección de drogas de abuso. Los procedimientos de radioinmunoensayo o radioinmunoanálisis (RIA) fueron los primeros que se desarrollaron, sin embargo, éstos han sido reemplazado por inmunoensayos enzimáticos y métodos de fluorescencia polarizada. Los métodos RIA adolecen de varias limitaciones prácticas, incluyendo la corta vida de almacenamiento del reactivo, el manejo especial del reactivo y los requerimientos el manejo de los residuos, así como la falta de un procedimiento completamente automatizado.[ref\(2013\)](#)

Los ensayos enzimáticos homogéneos, como el sistema TIAE (Syva Co., Palo Alto, CA 94303) están bien establecidos y son ampliamente usados para el tamizaje de drogas de abuso en orina (DAU). Este procedimiento se basa en la unión competitiva entre la droga no marcada presente en la muestra del paciente y la droga marcada con la enzima por el anticuerpo. Este ensayo se puede efectuar utilizando orina o suero como especimen y ofrecen buena sensibilidad y especificidad para una amplia variedad de drogas. El ensayo se debe realizar separadamente para cada droga individual o clase de droga que está siendo evaluada. Además se pueden obtener resultados cuantitativos.

Los ensayos de fluorescencia polarizada (Abbott Labs, Chicago, IL 60064) también se usan ampliamente y ofrecen buena sensibilidad y especificidad para la detección de drogas.



Estos ensayos utilizan una curva de calibración de seis puntos y pueden proporcionar resultados cuantitativos.

Un segundo sistema de inmunoensayo homogéneo, el método de inmunoensayo del donador enzimático clonado^{ref(2014)} (Tabla 51-11, método 2) se puede aplicar para el análisis de drogas. En este procedimiento, la enzima β -galactosidasa es producida como dos fragmentos inactivos, denominados *fragmento enzimático donador* y *fragmento enzimático aceptante*. El fragmento enzimático donador se conjuga con la droga de interés que se determinará en el espécimen del paciente. En ausencia de la droga en el espécimen, el anticuerpo dirigido contra la droga de interés se une al complejo donador enzimático-droga. Esta unión del anticuerpo al complejo donador enzimático-droga evita la asociación de los fragmentos donador y aceptante para formar la enzima activa. Por otra parte, si la droga está presente en el espécimen del paciente, ésta competirá con el conjugado por los sitios de unión al anticuerpo. Mientras mayor sea la cantidad de droga presente en el espécimen del paciente, mayor será la probabilidad de que el fragmento enzimático donador y el aceptante sean capaces de formar la enzima activa.

La cantidad de enzima activa está directamente relacionada a la concentración de la droga en la muestra. La enzima activa es monitoreada por la conversión del sustrato enzimático galactopiranosido a un producto colorido.

Otra metodología reciente de inmunoensayo para drogas de abuso es la interacción cinética de micropartículas en solución, o ICMS (Tabla 51-11, método 3). En este procedimiento turbidimétrico, la droga de interés se conjuga a las micropartículas del reactivo. La unión del anticuerpo específico antidroga a los conjugados micropartícula-droga produce la formación de retículas micropartícula- anticuerpo que bloquean la transmisión de luz, causando un incremento en la absorbancia de la solución de reacción. La adición del espécimen del paciente conteniendo la droga da como resultado la competencia entre la droga y los conjugados droga-partícula por la unión al anticuerpo presente en el reactivo. De esta manera, concentraciones altas de la droga de interés causan una inhibición de la formación de la retícula de micropartículas, incrementando la transmisión de luz a través de la solución del reactivo con una disminución subsecuente de la absorbancia. La concentración de la droga está inversamente relacionada con la absorbancia de la mezcla de reacción.

Existe un inmunoensayo que ofrece simultáneamente una detección visual discreta de siete clases de drogas en 10 minutos (Triage DOA, Biosite Diagnostica, San Diego, CA 92121).^{ref(2015)} Este sistema consiste en una técnica inmunoquímica que utiliza siete anticuerpos monoclonales diferentes para analizar múltiples compuestos simultáneamente por unión competitiva. El conjugado que lleva la marca consiste de una droga representativa de cada clase que está conjugada a una partícula de oro coloidal.

La competencia entre la droga libre y la droga conjugada por los sitios de unión al anticuerpo se lleva a cabo en la muestra de orina que contiene una o más drogas. La competencia entre la droga libre y la droga conjugada provoca que una cierta cantidad de los conjugados de la droga no se unan al anticuerpo. Después de un período de incubación de 10 minutos, la mezcla de reacción es transferida a una área de detección que consiste de una membrana de nylon conteniendo anticuerpos monoclonales inmovilizados. Los especímenes de orina que contienen la droga o drogas a ser medidas causarán que algunos de los conjugados de la droga no se mantengan unidos por el anticuerpo en la mezcla de reacción. Los conjugados de la droga que no están unidos al anticuerpo en la fase inicial del ensayo



serán capturados por el segundo anticuerpo inmovilizado, generando una banda colorida en la zona correspondiente a cada droga positiva. La presencia o ausencia de las bandas de color se determina visualmente.

El uso de procedimientos cromatográficos, como la cromatografía en capa fina (conocida ampliamente bajo su abreviatura inglesa TLC por “thin layer chromatography”) (Tabla 51-11, método 4), tiene la ventaja de que no requiere instrumentación y el procedimiento es relativamente económico.^{ref(2016)} Este procedimiento también permite la detección simultánea de un gran número de drogas. Aunque la sensibilidad de la TLC no es tan buena como la de los procedimientos de inmunoensayo, es apropiada para identificar pacientes con una sobredosis de droga así como consumidores de drogas con fines recreativos. La naturaleza cualitativa de la TLC así como el tiempo que consume cada ensayo, hasta tres horas, no permite el manejo estadístico de los resultados. Además, el método es laborioso y susceptible a errores de interpretación. El análisis de TLC ha sido reemplazado principalmente por inmunoensayos.

La cromatografía de líquidos de alta eficacia (conocida ampliamente bajo su abreviatura inglesa HPLC por “high performance liquid chromatography”) y la cromatografía de gases (CG) permiten separar y cuantificar mezclas complejas de fármacos. El análisis de drogas de abuso por técnicas cromatográficas es un procedimiento de etapas múltiples que requiere extracción de la muestra, elución y reducción de datos. El uso de HPLC y CG para el tamizaje de drogas de abuso ha sido limitado debido a su naturaleza tediosa. Un sistema automatizado de HPLC que ha sido introducido recientemente (REMEDI, Bio Rad Laboratories, Hercules, CA 94547) utiliza un diseño de multicolumnas para extracción y separación. Las drogas o metabolitos son identificados primero haciendo una exploración por ultravioleta y subsecuentemente se realiza la identificación por comparación con el tiempo de retención relativo y las características espectrales con una biblioteca de drogas “en línea”, almacenada en el sistema de la computadora. Este sistema tiene un alto grado de automatización, facilidad de operación, y un tiempo relativamente rápido de análisis de aproximadamente 30 minutos.

Especimen.

Varios especímenes biológicos incluyendo la orina, lavado gástrico o emesis, y suero o plasma pueden ser sometidos al tamizaje de drogas de abuso. La orina es considerada generalmente el espécimen ideal porque es usualmente fácil de obtener y la mayoría de las drogas se encuentran en cantidades suficientes para ser identificadas. Las desventajas de usar orina como espécimen incluyen la presencia de varios productos metabólicos que interfieren en la identificación, y el hecho de que el compuesto original a menudo ya no está presente. Además, la cuantificación de drogas en orina generalmente no correlaciona con los efectos de la droga. El análisis de lavado gástrico o emesis ofrece la ventaja de que la droga original puede estar presente, aunque las drogas que son rápidamente absorbidas o aquellas que no son ingeridas no serán detectadas. Además, la interferencia de alimentos ingeridos obstaculiza la identificación. El análisis de suero o plasma permite identificar la droga original, y su cuantificación puede ser de ayuda en el manejo del paciente. Las desventajas del tamizaje en suero o plasma incluyen limitaciones como la disponibilidad del volumen de la muestra, la baja concentración de la droga y la incapacidad para identificar ciertas drogas en una situación de sobredosis.



Plomo

M. WILSON TABOR

Principios del análisis

El método complejométrico de ditizona (difeniltiocarbazona), que ha sido utilizado por varios años, se desarrolló para medir plomo en muestras biológicas y ambientales (Tabla 51-12, método 1).[ref\(2017\)](#) En este procedimiento, las muestras (sangre, orina o tejido) son calcinadas mediante oxidación ácida y calentamiento a 400°C para remover el material orgánico. Después de reducir a cenizas, la muestra es redisuelta en agua acidificada y luego se alcaliniza con KCN-NH_4^+ a pH de 9 ó 10. Enseguida se agrega cianuro para prevenir reacciones laterales con otros metales y después la muestra se hace reaccionar con difeniltiocarbazona para producir un complejo rojo de plomo-ditizonato. El complejo se extrae con cloroformo y la absorbancia es medida a 510 nm. Este procedimiento es tedioso y lento, requiere de grandes cantidades de material de vidrio y reactivos limpios (libres de plomo), y está sujeto a interferencia por estaño (II), bismuto y talio.

La técnica más frecuentemente usada para determinar plomo es la espectroscopía de absorción atómica (EAA), usualmente la que no utiliza flama (EAAsF). En el método clásico de EAA (Tabla 51-12, método 2a) la muestra se calcina mediante un método semejante al descrito para ditizona. Después de calcinar la muestra, la solución que contiene el plomo iónico es conducida por aspiración a una flama de aire-acetileno donde el plomo es reducido al estado atómico Pb^0 . La cuantificación de plomo se lleva a cabo por medición espectrofotométrica de la luz absorbida por el plomo en su frecuencia de resonancia característica de 283.3 nm. Se han descrito numerosas variaciones a este procedimiento.[refs\(2018\)](#)

La técnica en microescala de Delves (Tabla 51-12, método 2b) es una variación de la EAA que se usa comúnmente para determinaciones de plomo en sangre y en orina.[ref\(2019\)](#) Este método no utiliza el procedimiento de calcinado. Aquí, el espécimen se coloca en una copa especial de níquel que contiene peróxido de hidrógeno, el cual oxida parcialmente la muestra. Las ventajas de esta técnica incluyen el uso de un tamaño de muestra pequeño y una mayor velocidad de análisis, debido a que el pretratamiento de la muestra es mínimo. Sin embargo, se debe tener especial cuidado en las variaciones en la calidad de las copas que llevan la muestra.

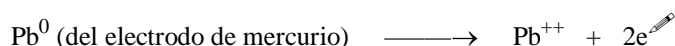
El procedimiento más ampliamente usado y recomendado para medir plomo en suero es el “libre de flama” (EAAsF) o procedimiento electrotérmico de AA, también conocido como técnica de horno de grafito[ref\(2020\)](#) y barra de carbón[ref\(2021\)](#) (Tabla 51-12, método 2c). En los procedimientos electrotérmicos, la muestra se aplica a un tubo de grafito o barra de carbón. La muestra se mezcla usualmente con un “modificador de matriz”, que mantiene el plomo en una forma constante y minimiza las interferencias causadas por la matriz. El tubo de grafito es entonces calentado por una resistencia eléctrica en una secuencia gradual; una temperatura de secado de 100°C, una temperatura de carbonización de 400°C, y finalmente una temperatura de atomización de 2000°C a 2500°C. El paso de carbonización remueve el material orgánico o inorgánico que pueda interferir en el ensayo. La atomización genera

vapor de Pb^0 , que absorbe luz a 280.2 y 283.3 nm. Debido a que el Pb^0 formado durante la atomización se escapa rápidamente por difusión, la señal es generada solamente por unos cuantos segundos. La concentración de plomo en la muestra usualmente se calcula a partir del área bajo el pico de absorbancia.[ref\(2022\)](#)

Otra técnica para análisis de plomo es el método electroquímico de voltametría de remoción anódica (VRA) (Tabla 51-12, método 3). Este método se usa extensamente para la cuantificación de plomo en muestras biológicas. En este procedimiento, el plomo iónico en sangre u orina es reducido a plomo elemental mediante el potencial negativo de un electrodo de mercurio:



Después de un intervalo de tiempo preseleccionado, el potencial del electrodo de mercurio se ajusta a valores positivos, dando lugar a la reoxidación de plomo del electrodo. La reoxidación de plomo origina la producción de una corriente anódica que es proporcional a la concentración de plomo en el especimen.



Los métodos de VRA han presentado dificultades para alcanzar la sensibilidad para medir plomo en sangre por debajo del límite superior del intervalo de referencia de 100 $\mu\text{g/L}$, aunque mejoras recientes en el método pueden haber resuelto este problema. La técnica de VRA tiene un amplio rango lineal de aproximadamente 60 a 10,000 $\mu\text{g/L}$.[ref\(2023\)](#) Las desventajas de esta técnica son la interferencia por talio, que puede ocurrir cuando el plomo y cadmio están presentes en el especimen en concentraciones comparables, y su relativamente pobre respuesta.

Especimen

La sangre total es el especimen de elección para la determinación de plomo en humanos, aunque también se puede utilizar orina. Se pueden usar tubos vacutainerJ libres de plomo conteniendo heparina o EDTA. Se debe tener cuidado extremo para prevenir contaminación externa del especimen. Los tubos libres de plomo para muestreo de sangre están disponibles comercialmente (Becton Dickinson, Rutherford, NJ 07070).

El plomo se puede perder durante el almacenamiento por absorción al recipiente usado para almacenarlo. Se puede perder hasta el 80% de plomo después de almacenarlo por una semana.[ref\(2024\)](#) La adición de ácido cítrico al 1% o de peróxido de hidrógeno al 3% al especimen contribuirá a preservar la muestra hasta por 5 días.[ref\(2025\)](#) Las muestras colectadas con EDTA (1.5 mg/mL de sangre) y congeladas a -20°C son estables por varios meses.[ref\(2026\)](#) Una vez elegido el método de análisis y usando EDTA como anticoagulante, se debe adicionar cloruro de calcio (1.4 mg/L de sangre) para aumentar la recuperación de plomo del especimen.[ref\(2027\)](#)

La orina para las determinaciones de plomo se debe coleccionar en botellas libres de plomo. Este ensayo requiere de la adición de timol (500 mg/mL de orina) como preservativo. Los especímenes que se coleccionan y conservan adecuadamente son estables hasta por una



semana si se mantienen refrigerados.

Intervalo de referencia

La exposición de individuos a plomo se puede clasificar como ocupacional o ambiental. El límite de exposición de plomo en sangre en trabajadores se ha establecido en 600 $\mu\text{g/L}$ (2.9 $\mu\text{mol/L}$).[ref\(2028\)](#) Los valores en niños son menores que los encontrados en adultos; los valores <100 $\mu\text{g/L}$ son considerados seguros para niños.[ref\(2029\)](#) Se ha reportado que niños y hombres adultos tienen concentraciones de plomo en sangre hasta 20% más altas que las encontradas en niñas y en mujeres adultas.[ref\(2030\)](#)

Salicilatos

ROSS L. G. NORRIS

DONALD DAVIS

JULIA M. POTTER

Principios del análisis

El ácido acetilsalicílico (aspirina) es un analgésico usado comúnmente que es responsable de un número substancial de intoxicaciones accidentales en niños. El ácido acetilsalicílico se hidroliza a ácido salicílico y ácido acético dentro del estómago, permitiendo que el ácido salicílico se absorba fácilmente en la sangre.

Los métodos en uso más comunes para la determinación de salicilatos aún son espectrofotométricos. El procedimiento espectrofotométrico usado con mayor frecuencia está basado en cambios de absorbancia a 540 nm que ocurren a raíz de la producción de un complejo colorido formado después de la reacción de salicilato con el ion férrico (Tabla 51-13, método 1a). Se han sugerido una variedad de modificaciones a este procedimiento, incluyendo la extracción de salicilato en dicloruro de etileno acidificado para eliminar la interferencia de los metabolitos de salicilato[ref\(2031\)](#) y la precipitación de proteínas con cloruro mercúrico y ácido clorhídrico.[ref\(2032\)](#) Esta última modificación, propuesta por Trinder,[ref\(2033\)](#) ha sido automatizada y es uno de los procedimientos más comunes actualmente (ACA Discrete Analyzer, Wilmington, Delaware). Este procedimiento automatizado utiliza un blanco de lectura para aumentar la especificidad del ensayo.

Otro tipo de procedimiento espectrofotométrico emplea una mezcla de ácido fosfotúngstico y ácido fosfomolibdico (reactivo Folin-Ciocalteu) para reducir los salicilatos a un complejo azul que se puede medir a 660 nm (Tabla 51-13, método 1b).[ref\(2034\)](#) Este procedimiento está sujeto a interferencia de substratos endógenos incluyendo triptofano, tirosina y ácido úrico; todos reaccionan para formar complejos azules.

Un procedimiento comúnmente usado para la determinación de salicilato es la fluorescencia polarizada (IPF) (Tabla 51-13, método 2). Este ensayo está basado en la unión competitiva de salicilato marcado con fluoresceína y salicilato presente en la muestra del paciente por un número limitado de sitios de unión del anticuerpo. Ver el capítulo 13 para la descripción de la técnica de IPF.

La técnica de inmunoensayo de amplificación enzimática (TIAE) (Tabla 51-13, método 3) es otro procedimiento de inmunoensayo competitivo frecuentemente usado para medir salicilato. El principio general de este ensayo espectrofotométrico está descrito en el capítulo



13.

El método candidato de referencia para determinaciones de salicilato emplea una separación cromatográfica de gas-líquido (CGL) con detección de ionización de flama (Tabla 51-13, método 4).[ref\(2035\)](#) Este procedimiento permite la cuantificación de acetilsalicilato y sus metabolitos después de su extracción de plasma a dietil éter, junto con ácido *p*-tolúico, como estándar interno. Enseguida, el éter es evaporado y se adiciona bis-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) al residuo y se calienta. Una alícuota de esta mezcla es analizada por CGL.

Especimen

Se puede usar suero o plasma. Para el procedimiento automatizado colorimétrico modificado de Trinder, el uso de plasma se debe restringir a plasma heparinizado. Además, se ha demostrado que la azida de sodio en concentraciones de 1 mg/mL (15.4 nmol/L) incrementa significativamente los resultados.

Rango terapéutico

Los rangos terapéuticos para salicilatos totales en suero requieren ser interpretados en el contexto de la condición que se está tratando. Para uso como analgésico o antipirético, el rango terapéutico es menor de 100 µg/mL (<0.72 mmol/L). Si se usa como agente antiinflamatorio, las concentraciones terapéuticas van de 150 a 300 µg/mL (1.09 a 2.17 mmol/L). Puede observarse náusea, vómito e hiperventilación a concentraciones de 250 a 400 µg/mL (1.81 a 2.9 mmol/mL), pero concentraciones mayores de 600 µg/mL (4.34 mmol/L) son a menudo fatales.

Referencias

1. Loomis TA: Essentials of toxicology, ed 3, Philadelphia, 1978, Lea & Febiger.
2. Gossel TA, Bricker JD: Principles of clinical toxicology, ed 2, New York, 1990, Raven Press, pp 413.
3. Porter WH: Chiral pharmacology; the left- and right-hand nature of drugs, *Therapeutic Drug Monitoring/Toxicology In-Service Training & Continuing Education* 11(1):7-115, 1989.
4. Wainer IW, Granvil CP: Stereoselective separations of chiral anticancer drugs and their application to pharmacodynamic and pharmacokinetic studies, *Ther Drug Monit* 15:570-575, 1993.
5. Nebert DW, Nelson DR, Coon MJ, et al: The P-450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, and recommended nomenclature, *DNA Cell Biol* 10:1-14, 1991.
6. Litovitz TL, Schmitz BF, Bailey KM: 1991 Annual report of the American Association of Poison Control Centers National Data Collection System, *Am J Emerg Med* 10:452-505, 1992.
7. Wong SHY: Rational utilization of the toxicology laboratory, *Crit Care Rep* 2:295-306, 1991.
8. Merigian KS, Schroeder TJ, Tasset JJ, Pesce A: Toxicology screening pattern in Hamilton County, Ohio: review of 1710 comprehensive drug screens in 5 area hospitals, *J Clin Lab Anal* 2:112-116, 1988.
9. Hanenson IB, editor: *Quick reference to clinical toxicology*, Philadelphia, 1980, Lippincott.
10. Kulig K: Initial management of ingestions of toxic substances, *N Engl J Med* 326:1677-1681, 1992.
11. Stockley I: Drug interactions: a source book of adverse interactions, their clinical importance, mechanisms and management, ed 2, Oxford, 1991, Blackwell Scientific Publications.
12. Glynn JP, Kendal SE: Paracetamol measurement, *Lancet* 1:1147-1148, 1975.
13. Howie D, Adriaenssens PI, Prescott LF: Paracetamol metabolism following overdose: application of high performance liquid chromatography, *J Pharm Pharmacol* 29:235-237, 1977.



14. Armbuster DA, Schwarzhoff RH, Hubster EC, Liserio MK: Enzyme immunoassay, kinetic microparticle immunoassay, radioimmunoassay, and fluorescence polarization immunoassay compared for drugs-of-abuse screening, *Clin Chem* 39(10):2137-2146, 1993.
15. Department of Health and Human Services: Mandatory guidelines for federal workplace drug testing programs: final guideline notice, *Fed Reg* 53:11969-11989, 1989.
16. Berry DJ, Grove J: Emergency toxicological screening for drugs commonly taken in overdose, *J Chromatogr* 80:205-220, 1973.
17. Sunshine I, editor: Methodology for analytical toxicology, ed 2, Cleveland, 1975, CRC Press.
18. Natelson S: *Techniques in clinical chemistry*, ed 3, Springfield, Ill., 1971, Charles C Thomas, Publisher.
19. Curry A: *Poison detection in human organs*, ed 4, Springfield, Ill., 1988, Charles C Thomas, Publisher.
20. Selected methods of emergency toxicology. In Frings CS, Faulkner WR, editors: *Selected methods of clinical chemistry*, vol 11, Washington, D.C., 1986, American Association for Clinical Chemistry.
21. Fisher DS: A method for rapid detection of acute iron toxicity, *Clin Chem* 13:6-11, 1967.
22. Wu AHB, Wong SS, Johnson KG, et al: Evaluation of the triage system for emergency drugs-of-abuse testing in urine, *J Anal Toxicol* 17:241, 1993.
23. Armbruster DA, Hubster EC, Kaufman MS, Ramon MK: Cloned enzyme donor immunoassay (IDEC) for drugs-of-abuse screening, *Clin Chem* 41(1):92-98, 1995.
24. Blass KG: A rapid simple thin-layer chromatography drug screening procedure, *J Chromatogr* 95:75-79, 1974.
25. Cholak J, Hubbard D, Burkey R: Microdetermination of lead in biological material with dithizone at high pH, *Anal Chem* 20:671-672, 1948.
26. Kopito L, Schwachman H: Measurement of lead in blood, urine and scalp hair by atomic absorption spectrometry, *Standard Methods Clin Chem* 7:151-162, 1972.
27. Yeager DW, Cholak J, Henderson EW: Determination of lead in biological and related material by atomic absorption spectrophotometry, *Environ Sci Technol* 5:1020-1022, 1971.
28. Olsen ED, Jatlow PI: An improved Delves cup atomic absorption procedure for determination of lead in blood and urine, *Clin Chem* 18:1312-1317, 1972.
29. Sunderman FW: Electrothermal atomic absorption spectrometry of trace metals in biological fluids. In Forman DT, Matton RW, editors: *Clinical chemistry*: ACS Symposium Series 36, Washington, D.C., 1975, American Chemical Society.
30. Parsons PJ, Slavin W: A rapid zeeman graphite furnace atomic absorption spectrometric method for the determination of lead in blood, *Spectrochimica Acta* 48B: 925-939, 1993.
31. Lead in blood, method no. P&CAM 195. In Taylor DG: *Manual coordination: NIOSH Manual of analytical methods*, ed 2, vol 1, Washington, D.C., 1977, US Government Printing Office, pp 195-1 to 195-7.
32. Meranger JC, Hollebone BR, Blanchette GA: The effects of storage times, temperature and container types on the accuracy of atomic absorption determination of Cd, Cu, Hg, Pb, and Zn in whole heparinized blood, *J Anal Toxicol* 5:33-41, 1981.
33. Unger BC, Green VA: Blood lead analysis: lead loss to storage containers, *Clin Toxicol* 11:237-243, 1977.
34. Critique: Blood lead analysis, 1981, document no. 34Q205158208, Atlanta, Ga., May 1982, Centers for Disease Control, US Department of Health and Human Services.
35. "Criteria for a recommended standard. Occupational exposure to inorganic lead," revised criteria, NIOSH, DHEW Publ no 78-158, Washington, D.C., 1978, Superintendent of Documents, US Government Printing Office.
36. *Airborne lead in perspective*, Report of the Committee on Biological Effects of Atmosphere Pollutants of the National Research Council\National Academy of Sciences, Washington, D.C., 1972, Printing and Publishing Offices.
37. *Airborne lead in perspective*, Report of the Committee on Biological Effects of Atmospheric Pollutants of the National Research Council\National Academy of Sciences, Washington, D.C., 1972, Printing and



Publishing Offices.

38. Brodie BB, Udenfriend S, Coburn AF: The determination of salicylic acid in plasma, *J Pharmacol* 80:114-117, 1944.
39. Trinder P: Rapid determination of salicylate in biological fluid, *Biochem J* 57:301-303, 1954.
40. Weichselbaum TE, Shapiro I: A rapid and simple method for the determination of salicylic acid in small amounts in blood plasma, *Am J Clin Pathol* 9:42-44, 1945.
41. Rance ML, Jordan BI, Nichols JD: A simultaneous determination of acetylsalicylic acid, salicylic acid, and salicylamide in plasma by gas-liquid chromatography, *J Pharm Pharmacol* 27:425-429, 1975.

Bibliografia

- Bailey DN: Drug use in patients admitted to a university trauma center: results of limited (rather than comprehensive) toxicology screening, *J Anal Toxicol* 14:22-24, 1990.
- Baselt RC, Cravey RH: *Disposition of toxic drugs and chemicals in man*, ed 4, Chicago, 1994, Chem Toxicol Inst, p 1000.
- Bayer MJ, Rumack BH, Wanke LA: *Toxicologic emergencies*, Bowie, Md., 1984, Prentice-Hall, pp 341.
- Bowman WC, Rand MJ: *Textbook of pharmacology*, ed 2, Oxford, England, 1980, Blackwell Scientific Publications.
- Brancato DJ, Nelson RC: Poisoning mortality in the United States 1980, *Vet Hum Toxicol* 26:273-275, 1984.
- Cravey RH, Baselt RC: *Introduction to forensic toxicology*, Davis, Calif., 1981, Biomedical Publications, pp 299.
- Dreisbach RH, Robertson WO: *Handbook of poisoning*, ed 12, Los Altos, Calif., 1987, Appleton & Lange.
- Evans WE, Schentag JJ, Jusko WJ, editors: *Applied pharmacokinetics: principles of therapeutic drug monitoring*, ed 3, Spokane, Wash., 1992.
- Gerson B: Clinical toxicology I & II, *Clin Lab Med* 10:261-439, 441-647, 1990.
- Gibaldi M: Biopharmaceutics and clinical pharmacokinetics, ed 4, Philadelphia, 1991, Lea & Febiger, pp 406.
- Goodman AG, Goodman LS, Gilman A: *The pharmacological basis of therapeutics*, ed 8, New York, 1990, Macmillan, pp 1840.
- Haddad LM, Winchester JF: *Clinical management of poisoning and drug overdose*, ed 2, Philadelphia, 1990, Saunders, pp 1608.
- Klaassen CD, Andur MO, Doull J, editors: *Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons*, ed 5, New York, 1995, Macmillan, p 1056.
- Lave LB, Upton AC, editors: *Toxic chemicals, health, and the environment*, Baltimore, 1987, Johns Hopkins University Press.
- Merigian KS: *Drug overdose*, parts I and II. Therapeutic Drug Monitoring and Toxicology LIP Program, 13(17)7-13, (18)7-14, Washington, D.C., 1992, American Association for Clinical Chemistry.
- Morrow CT, Popper C: The clinical utility of toxicologic testing, *Crit Care Rep* 2:307-317, 1991.
- Noji EK, Kelen GD: *Manual of toxicologic emergencies*, St. Louis, 1989, Mosby, p 850.
- Poklis A: Toxicology. In Dufour R, Rifai N, editor: *Professional practice in clinical chemistry: a review*, Washington, D.C., 1993, American Association for Clinical Chemistry.
- Rumack BH, Peterson RC, Koch GG, Amara IA: Acetaminophen overdoses: 662 cases with evaluation of oral acetylcysteine treatment, *Arch Intern Med* 141:380-385, 1981.
- Warner AM, Hohnadel DC, Pesce AJ, editors: *Professional practice in toxicology: a review*, Washington, D.C., 1992, American Association for Clinical Chemistry, pp 598.
- Wong SHY: Novel liquid chromatographic techniques for clinical drug analysis, *Therapeutic Drug Monitoring/Toxicology In-Service Training & Continuing Education* 13(16):5-18, 1992.

Tablas

Tabla 51-1. Clasificación de toxicidad.

<u>Dosis letal probable (humano)</u>		
Grado o clase de toxicidad	Cantidad	Para un hombre de 70 Kg (150 libras)
6 Supertóxico	< 5 mg/kg	Una probada (< 7 gotas)
5 Extremadamente tóxico	5-50 mg/kg	Entre 7 gotas y una cucharada
4 Muy tóxico	50-500 mg/kg	Entre una cucharada y 30 mL
3 Moderadamente tóxico	05-5 g/kg	Entre 30 y 500 mL
2 Ligeramente tóxico	5-15 g/kg	Entre 0.5 y 1 L
1 Prácticamente no tóxico	> 15 g/kg	Más de 1 L

Tabla 51-2. LD₅₀ aproximada para determinados agentes químicos.

Agente	Animal	Ruta	LD ₅₀ (mg/kg)
Alcohol etílico	Ratón	Oral	10,000
Cloruro de sodio	Ratón	i.p.	4,000
Sulfato de fierro	Rata	Oral	1,500
Sulfato de morfina	Rata	Oral	900
Fenobarbital sódico	Rata	Oral	150
DDT	Rata	Oral	100
Picrotoxin	Rata	s.c.	5
Sulfato de estricnina	Rata	i.p.	2
Nicotina	Rata	i.v.	1
D-Tubocoraina	Rata	i.v.	0.5
Hemicolinium-3	Rata	i.v.	0.2
Tetrodoxina	Rata	i.v.	0.1
Dioxina	Cobayo	i.v.	0.001
Toxina de <i>Botulinus</i>	Rata	i.v.	0.00001

i.p., intraperitoneal; *i.v.*, intravenosa; *s.c.*, subcutánea.
De Loomis TA: *Essentials of toxicology*, ed 3, Philadelphia, 1978, Lea and Febiger.

Tabla 51-3. Número de muertes reportado por tipo de fármaco, y cálculo como porcentaje del número de exposiciones (intoxicación potencial).

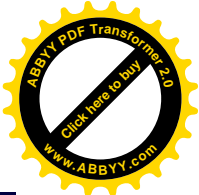
Categoría	Número	Porcentaje de todas las exposiciones por categoría
-----------	--------	--



Analgésicos	190	0.104
Antidepresivos	188	0.525
Sedantes/hipnóticos	97	0.166
Estimulantes y drogas de abuso	90	0.434
Agentes cardiovasculares	87	0.348
Alcoholes	72	0.143
Gases y vapores	49	0.188
Terapias para asma	39	0.229
Agentes químicos	37	0.069
Hidrocarburos	36	0.057
Substancias de limpieza	26	0.014
Plaguicidas (incluidos los rodenticidas)	18	0.026
Obtenido de Litovitz TL, Schmitz BF, Bailey KM: <i>Am J Emerg Med</i> 10: 452-505, 1992.		

Tabla 51-4. Resultados de laboratorio del tamizaje de fármacos en el Hospital John Hopkins durante los meses de octubre, noviembre y diciembre de 1989.

Medicamentos	
Cocaína/metabolito	837
Etanol	757
Opiáceos	677
Acetaminofén	373
Canabinoides	311
Antidepresivos	279
Benzodiazepinas	218
Difenidramina	208
Salicilato	205
Metadona	203
Lidocaína	161
Barbituratos	156
Efedrina/pseudoefedrina	138
Fenitoína	121
Fenotiazina/metabolitos	121
Otros	
Anfetamina	2
Carbamezapina	50
Phencyclidine	4
No medicamentos	
Nicotina/cotina	1691
Cafeína	1310
Quinina/quinidina	896
Metanol	5
Total de fármacos/ substancias identificados	6874

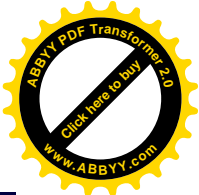


De: Wong SHY: *Crit Care Rep* 2:295-306, 1991.



Tabla 51-5. Algunas características clínicas de intoxicación severa de drogas reportadas en casos de sobredosis

Clase:	Analgésico
Agente:	Acetaminofén
Pupilas:	—
Respiración:	—
Otras:	Toxicidad hepática
Clase:	Hipnótico
Agente:	Barbituratos
Pupilas:	Dilatadas, reactivas a la luz
Respiración:	↓
Otras:	Parálisis flácida, hipotermia, hipotensión
Clase:	Tranquilizante menor
Agente:	Benzodiazepinas
Pupilas:	-
Respiración:	↓
Otras:	Depresión del SNC, cambios en el sistema extrapiramidal, y en el sistema nervioso autónomo, hipotensión
Clase:	Depresivo
Agente:	Etanol
Pupilas:	—
Respiración:	↓
Otras:	Depresión del SNC (en algunas convulsiones epilépticas)
Clase:	Analgésico
Agente:	Narcóticos y propoxifeno
Pupilas:	Localizadas
Respiración:	↓
Otras:	Depresión del SNC
Agente:	Salicilatos
Pupilas:	—
Respiración:	↓
Otras:	Acidosis metabólica (posterior)
Clase:	Antidepresivo
Agente:	Tricíclicos
Pupilas:	Reducidas
Respiración:	—
Otras:	Taquicardia, arritmia
Clase:	Estimulante
Agente:	Cocaína
Pupilas:	Dilatadas
Respiración:	↑
Otras:	Efectos en SNC, euforia, agitación,



	convulsiones, efectos cardiacos, taquicardia
CNS, Central Nervous System. Obtenido de Kulig K: <i>N Engl J Med</i> 326:1677-1681, 1992.	



Tabla 51-6. Los síndromes tóxicos más comunes.

Síndromes anticolinérgicos

- Signos comunes** Delirio con habla entre dientes, taquicardia, resequedad, piel sonrojada, pupilas dilatadas, espasmo clónico, temperatura ligeramente elevada, retención urinaria, y sonidos disminuidos del intestino. En casos severos pueden ocurrir convulsiones y disritmias.
- Causas comunes** Antihistamínicos, medicamentos antiparkinsonianos, atropina, escopolamina, amantadina, agentes antipsicóticos, agentes antidepresivos, agentes antiespasmódicos, agentes midriáticos, relajantes músculo- esqueléticos, y varias plantas (principalmente estramonio y *Amanita muscaria*).

Síndromes simpatomiméticos

- Signos comunes** Alucinaciones, paranoia, taquicardia (o bradicardia si el fármaco es un agonista alfa-adrenérgico puro), hipertensión, hiperpirexia, diaforesis, piloerección, midriasis e hiperreflexia. Convulsiones, hipotensión y disritmias pueden ocurrir en casos severos.
- Causas comunes** Cocaína, anfetamina, metanfetamina (y sus derivados 3,4-metiléndioxianfetamina, 3,4-metiléndioximetanfetamina y 2,5-dimetoxi-4- bromoanfetamina), y descongestionantes que no requieren receta médica (fenilpropanolamina, efedrina y pseudoefedrina). Hallazgos semejantes en sobredosis de cafeína y teofilina, excepto los signos psiquiátricos orgánicos, causados por la liberación de catecolaminas.

Intoxicación por opiáceos, sedantes y etanol

- Signos comunes** Coma, depresión respiratoria, miosis, hipotensión, bradicardia, hipotermia, edema pulmonar, disminución de sonidos intestinales, hiporreflexia y marcas de aguja hipodérmica. Pueden ocurrir convulsiones después de la sobredosis de algunos narcóticos, principalmente propoxifeno.
- Causas comunes** Narcóticos, barbituratos, benzodiazepinas, etclorvinol, glutetimida, metoxiprilon, metaqualone, meprobamato, etanol, clonidine, y guanabenz.

Síndromes colinérgicos

- Signos comunes** Confusión, depresión del sistema nervioso central, debilidad, salivación, lagrimeo, incontinencia urinaria y fecal, calambres gastrointestinales, emesis, diaforesis, contracciones musculares fasciculares, edema pulmonar, miosis, bradicardia o taquicardia y convulsiones.
- Causas comunes** Plaguicidas organofosforados y carbamatos,



physostigmine, edrophonium y algunos hongos.

Obtenido de Kulig K: *N Engl J Med* 326:1677-1681, 1992.

Tabla 51-7. Antagonistas y antídotos específicos.

Fármaco o toxina	Antagonista o antídoto
Acetaminofén	Metionina, <i>N</i> -acetilcisteína
Anfetaminas	Clorpromazina
Drogas anticolinérgicas (antidepresivos tricíclicos, atropina, escopolamina)	Physostigmine
Benzodiazepinas	Flumazenil
Receptores de bloqueadores -adrenérgicos	Glucagón
Bloqueadores de canales de calcio, ácido fluorhídrico, fluoruros	Calcio
Monóxido de carbono	Oxígeno
Cianuro	Nitrito de sodio
Isoniazida, hidrazina, monometilhidrazina (en especies de hongos <i>Gyromitra</i>)	Piridoxina
Metanol, etilén glicol	Etanol
Nitratos y nitritos	Azul de metileno
Opiáceos	Naloxano
Organofosfatos	Atropina y pralidoxima
Antidepresivos tricíclicos	Bicarbonato

Tabla 51-8. Ejemplos de interacciones de clases de fármacos.

Acción	Ejemplo
Fármacos con efectos similares	Múltiples compuestos nefrotóxicos como gentamicina y semejantes a cefalosporina producen un incremento en nefrotoxicidad .
Fármacos con efectos opuestos	Hipnóticos y cafeína producen antagonismo al efecto hipnótico.
Interacciones de absorción	La incorporación de tetraciclina es disminuida cuando se administra fierro (Fe^{++}) como suplemento.
Interacciones que desplazan la droga	El desplazamiento teórico de la droga unida de albúmina produce un nivel mayor de la droga libre.
Interacciones del metabolismo de fármacos	
Inducción enzimática	Los barbituratos estimulan la oxidación

		microsomal de compuestos como dicumarol, produciendo menores niveles en plasma.
Inhibición enzimática		Cimetidina bloquea la vía de oxidación de P-450, disminuyendo el metabolismo de teofilina, lo que provoca una vida media más larga y mayores niveles en plasma.
Interacciones que alteran la excreción		
Cambios en el pH de la orina		La orina ácida aumenta la excreción del agente básico. Lo inverso es cierto para fármacos ácidos.
Competencia por secreción		Probenecid bloquea la secreción activa de medicamentos tubular activa como penicilina, incrementando de esta manera los niveles séricos.
Interacciones en neuronas secreción adrenérgicas		Los antidepresivos tricíclicos previenen la captación de guanethidine en neuronas, bloqueando así su efecto hipertensivo.

Tabla 51-9. Métodos para análisis de acetaminofén.

Método:	1. Prueba de la mancha
Principio:	Acetaminofén reacciona con <i>o</i> -cresol para producir el compuesto colorido azul de indofenol
Uso:	Orina Prueba de tamizaje
Comentarios:	Cualitativo Sensible
Método:	2. Espectrofotométrico (formación de nitrocolorante)
Principio:	La absorbancia del producto es monitoreada a 430 nm. Plasma
Uso:	Uso infrecuente
Comentarios:	Rango lineal de 100 a 500 µg/mL Específico
Método:	3. Cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC) (en fase inversa)
Principio:	Separación cromatográfica de acetaminofén utilizando una columna empacada con sílica recubierta con 10-octadecilsilano y agua/ácido acético/acetato de etilo como fase móvil
Uso:	Posible método de referencia
Comentarios:	El más sensible (1µg/mL)
Método:	4. Técnica de inmunoensayo de amplificación enzimática

Principio:	Ensayo de unión competitiva. El fármaco en la muestra del paciente compite con el complejo fármaco-enzima por un número limitado de sitios en el anticuerpo a acetaminofén. La unión del complejo fármaco-enzima al anticuerpo inhibe la actividad enzimática. La cantidad de enzima está directamente relacionada con la concentración del fármaco.
Uso:	Frecuentemente usado
Comentarios:	Automatizado Disponibile con un sistema estadístico
Método:	5. Fluorescencia polarizada
Principio:	Ensayo de unión competitiva. El fármaco en la muestra del paciente compite con el complejo fármaco marcado-fluoresceína por un número limitado de sitios de unión al anticuerpo. La cantidad de luz polarizada emitida del recipiente de reacción es inversamente relacionada con la concentración del fármaco.
Uso:	El más frecuentemente usado
Comentarios:	Automatizado Disponibile con un sistema estadístico Requiere equipo especializado

Tabla 51-10. Pruebas de la mancha.

Agente:	Acetaminofén
Espécimen usado:	Orina
Reacción:	(NH ₄ OH) o-cresol + Acetaminofén → Color azul
Tiempo de análisis (min):	15 Altamente sensible y específico
Referencia:	16
Agente:	Etanol
Espécimen usado:	Orina, suero
Reacción:	Microdifusión en dicromato $2K_2Cr_2O_7 + 10H_2SO_4 + 3C_2H_5OH \rightarrow$ $2Cr_2(SO_4)_4 + 2K_2SO_4 + 3CH_3COOH$ $+ 11H_2O + 4H^+$ (color verde a azul)
Tiempo de análisis (min):	15-30
Comentarios:	Buena sensibilidad No específico para etanol
Referencia:	17
Agente:	Salicilato
Espécimen usado:	Orina, suero
Reacción:	Solución de Trinder Salicilato + FeCl ₃ → Complejo color



	<i>violeta</i>
Tiempo de análisis (min):	2
Comentarios:	Buena especificidad si se usa suero Buena sensibilidad
Referencia:	18
Agente:	Carbamatos (meprobamato)
Espécimen usado:	Orina
Reacción:	Furfural + meprobamato + tricloruro de antimonio → Color negro en placa de cromatografía de capa fina
Tiempo de análisis (min):	5
Comentarios:	No es específico para meprobamato Buena sensibilidad
Referencia:	19
Agente:	Imipramina/desipramina
Espécimen usado:	Orina
Reacción:	Reactivo de Forrest K_2CrO_3 (ácido) + Imipramina → Complejo <i>color verde</i>
Tiempo de análisis (min):	2
Comentarios:	Fenotiazinas pueden interferir
Referencia:	20
Agente:	Ethchlorovynol
Espécimen usado:	Orina, suero
Reacción:	Difenilamina + ethchlorovynol en ácido → Color rojo
Tiempo de análisis (min):	10
Comentarios:	Buena sensibilidad y especificidad
Referencia:	21
Agente:	Fenotiazinas
Espécimen usado:	Orina
Reacción:	Reactivo FPN (cloruro férrico/ácido perclórico/ácido nítrico) + fenotiazinas → Complejo colorido de <i>rojo a violeta</i>
Tiempo de análisis (min):	2
Comentarios:	Inespecífico Baja sensibilidad para algunas fenotiazinas
Referencia:	22
Agente:	Fierro
Espécimen usado:	Suero
Reacción:	Bathophenthroline cambia de color con fierro (azul)
Tiempo de análisis (min):	15
Comentarios:	No reaccionará a concentraciones normales de fierro
Referencia:	23

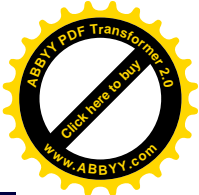




Tabla 51-11. Métodos de análisis para drogas de abuso.

Método	Principio	Uso	Comentarios
1. Inmunoensayo enzimático (EIE)	Unión competitiva entre la droga en la orina del paciente y la droga marcada con la enzima por el anticuerpo	El más frecuentemente usado Suero, orina	Buena sensibilidad y especificidad Resultados cuantitativos
2. Inmunoensayo de donador enzimático clonado (IDEC)	Unión competitiva entre la droga del paciente y la droga conjugada al fragmento donador de la enzima. La unión del anticuerpo al conjugado donador enzimático-droga previene la reasociación de los fragmentos enzima-donadora y encima-aceptante para producir la enzima activa. La cantidad de actividad enzimática es proporcional a la concentración de la droga en el espécimen	Orina	Automatizado
3. Interacción cinética de micropartículas en solución (ICMS)	Unión competitiva entre la droga en el espécimen del paciente y la droga conjugada a micropartículas. La ausencia de la droga en el espécimen del paciente causa la unión del anticuerpo pre-dominantemente a micropartículas y conduce a la formación de retículos micropartícula-anticuerpo, que bloquean la transmisión de luz a través de la solución del reactivo, causando una absorbancia aumentada del reactivo	Orina	Automatizado
4. Cromatografía de capa fina (TLC)	La droga es extraída del espécimen y sometida a cromatografía. La droga	Frecuentemente usada	Subjetiva No automatizada Sensibilidad limitada

separada cromatográficamente es identificada por su reacción química específica y propiedades cromatográficas

Tabla 51-12. Métodos para análisis de plomo.

Método	Principio	Uso	Comentarios
1. Espectrofotométrico	La muestra es calcinada, disuelta en agua acidificada, y luego se hace reaccionar con difeniltiocarbazona para formar un complejo rojo. El complejo se extrae en cloroformo y se mide a 510 nm	Rara vez se usa. Sangre, orina, tejidos, ambiental	Técnicamente demandante No requiere equipo costoso
2. Espectrofotometría de absorción atómica (EAA)			
a. Clásica	La muestra es calcinada y el plomo ionizado es reducido por calentamiento con flama de acetileno. El plomo atómico absorbe luz a 283.3 nm	Rara vez se usa. Sangre, orina, ambiental	Simple de realizar Requiere equipo costoso
b. Técnica en microescala Delve	Mismo procedimiento que en 2a, excepto que el calcinado de la muestra no se realiza. En su lugar, la muestra se oxida en una microcopa de níquel con H ₂ O ₂	Uso poco frecuente Sangre, orina	Igual que en 2a Se aplica a micromuestras
c. Horno de grafito o barra de carbón (EAAH)	Mismo procedimiento que en 2a, excepto que la muestra se vaporiza sobre una plataforma de grafito en un horno.	El método más usado. Sangre, orina	Igual que en 2b Semiautomatizado Recomendable



3. Voltametría de remoción anódica (VRA)	El plomo iónico en solución es reducido a plomo elemental en un electrodo negativo de Hg. El potencial se ajusta a valores más positivos causando reoxidación del plomo del electrodo de Hg. La corriente anódica resultante causada por la oxidación es proporcional a la concentración de plomo	Frecuentemente usado Sangre, orina	Simple de llevar a cabo Rango analítico amplio
--	---	------------------------------------	---

Tabla 51-13. Métodos para análisis de salicilatos.

Método	Principio	Uso	Comentarios
1. Espectrofotometría			
a. Complejo de nitrato férrico	El salicilato reacciona con Fe^{3+} para formar un complejo colorido ($A_{\text{max}} = 540 \text{ nm}$)	Uno de los métodos más utilizados	Automatizado
b. Reducción con reactivo de Folín-Ciocalteu	Acido fosfotúngstico + ácido fosfomolibdico reaccionan para formar un complejo azul ($A_{\text{max}} = 660 \text{ nm}$)	Uso poco común por triptofano, tiroxina y ácido úrico	Sujeto a interferencia
2. Fluorescencia polarizada (IPF)	Competencia entre el salicilato marcado con fluoresceína y el salicilato del paciente por un número limitado de sitios de unión al anticuerpo	Uno de los métodos más comunes actualmente en uso	Automatizado, interferencia de fluorescencia endógena
3. Técnica de inmunoensayo de amplificación enzimática (TIAE)	Competencia entre el salicilato marcado con la enzima y el salicilato en la muestra del paciente por la unión al anticuerpo. La unión del anticuerpo al salicilato unido a la enzima	Comúnmente usado	Automatizado

	produce inhibición de la actividad enzimática		
4. Cromatografía gas-líquido	El acetilsalicilato y sus metabolitos se extraen con éter	Candidato para método de referencia Para uso en investigación	Muy sensible No se conocen compuestos que interfieran

Figuras

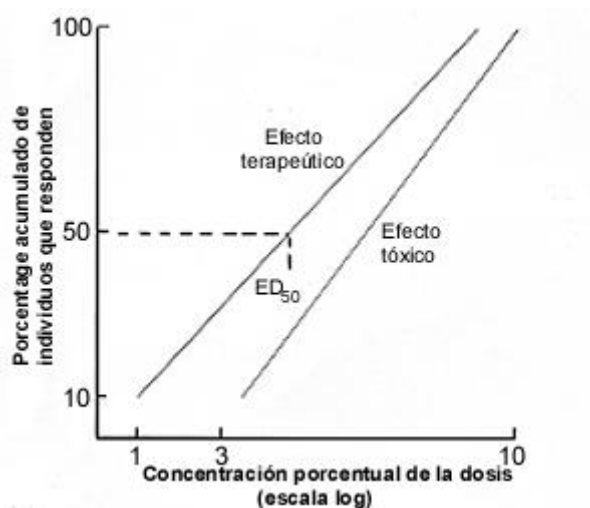


Figura 51-1 Resultados de los efectos terapéuticos y tóxicos en una población. ED_{50} , dosis efectiva para el 50% de la población.

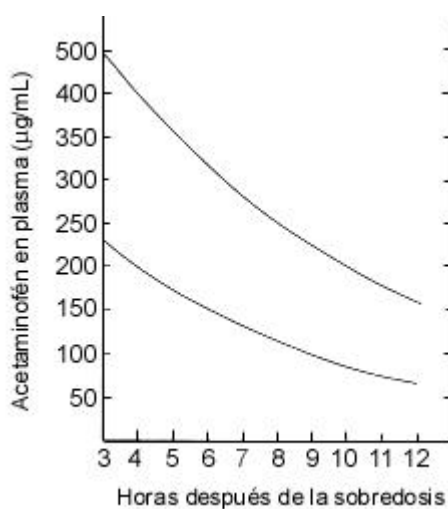




Figura 51-2 Concentración de acetaminofén en plasma con respecto al tiempo después de una sobredosis aguda. Es probable que el daño hepático sea severo por arriba de la línea superior, de severo a mediano entre las líneas y clínicamente insignificante por abajo de la línea inferior. (De: Prescott LF, Sutherland GR, Park J, et al: *Lancet* 2: 109-113, 1976.)

CAPÍTULO 52

52. Adicción y Abuso de Sustancias

R. Jeffrey Goldsmith

El proceso de adicción

Teorías para explicar la adicción

Prevalencia de adicción en distintos grupos

Fisiopatología del abuso crónico de sustancias

Diagnóstico de la adicción y abuso de sustancias

El proceso de tratamiento

Métodos de tamizaje prelaborales o aleatorizados

Por qué los pacientes fracasan en los tamizajes de drogas

Cambio de compuesto analizado en la enfermedad

OBJETIVOS

- ♦ Describir la serie de etapas que dan por resultado una adicción.
- ♦ Diferenciar las causas y factores que resultan en la prevalencia de adicción en jóvenes.
- ♦ Describir el método de diagnóstico de la adicción.
- ♦ Describir cómo los métodos de tamizaje de drogas son usados para detectar el abuso de drogas y monitorear la rehabilitación.

Términos Claves

abuso de sustancias término genérico que engloba el uso patológico de sustancias psicoactivas. No es un diagnóstico específico e incluye tanto la dependencia psicológica como la dependencia fisiológica. Para algunos autores, este término incluye el mal uso de alcohol y drogas que no estaría cubierto en el Manual de Diagnóstico y Estadística (DSM-III-R) de la Asociación Americana de Psiquiatría, y por lo tanto, no sería un diagnóstico psiquiátrico.

adicción uso compulsivo de un compuesto químico psicoactivo, que causa problemas en la vida del individuo tanto a nivel físico como psicológico o



socio cultural. Las defensas psicológicas inconscientes como la negación, son una característica común que distorsionan el conocimiento propio del adicto y confunden a las personas que lo rodean. La adicción es un proceso crónico de deterioro que lleva a la muerte o a la institucionalización si no se controla. La abstinencia permite a la mente y al cuerpo recuperarse lo suficiente como para trabajar sobre las deterioradas relaciones con el entorno y demás deficiencias de tipo social.

compulsión intensa urgencia para usar la droga, que puede ser de corta duración o tormentosamente crónica. Algunos adictos tienen en su entorno disparadores de este anhelo desesperado, en otros sus estados psicológicos evocan la urgencia, pero también existen aquellos en los cuales este deseo vehemente no se manifiesta en absoluto.

pactos de contingencia planes de conducta que comprometen al adicto en un programa de tratamiento cuidadosamente delineado. Las consecuencias del fracaso en el cumplimiento son claramente señaladas con la esperanza de que esto anime al adicto a permanecer en tratamiento.

recuperación proceso de crecimiento y desarrollo que ocurre después de una abstinencia sostenida. El factor espiritual es un elemento importante en la recuperación dada la necesidad de trascender el intenso enfoque propio o la experiencia de victimización que exhiben muchos adictos.

rehabilitación tratamiento amplio y de múltiples componentes para alcohólicos y adictos en abstinencia y no en fase de retirada. El tratamiento está dirigido hacia las consecuencias del uso de alcohol y drogas, hacia los problemas personales que no están directamente relacionados a la química de los mismos y hacia las habilidades necesarias para sobrellevar la abstinencia y la recuperación.

retirada fase de adaptación del sistema nervioso central a un cese relativamente abrupto de la administración de una sustancia psicoactiva, evidenciada por la manifestación de cambios físicos, psicológicos y de conducta. Los síntomas del denominado síndrome de retirada son frecuentemente opuestos a los efectos agudos de esa sustancia.

tamizaje de drogas análisis cualitativo de los fluidos corporales (orina, sangre, saliva, y otros) de un paciente con el objeto de detectar la posible presencia de sustancias adictivas. En la práctica, existe un perfil habitual de cinco a diez drogas a ser investigadas. Sin embargo, a veces se requiere ampliar el perfil y confeccionar una lista más extensa.

tolerancia adaptación conductual y neuroquímica a los efectos farmacológicos de una sustancia psicoactiva, lo que permite al individuo experimentar menor toxicidad hacia la misma. Cualquier persona puede exhibir alguna tolerancia; sin embargo, la mayoría de los adictos exhibe un grado de tolerancia significativamente mayor.

La adicción y el abuso de alcohol y drogas afectan a una porción significativa de la población de muchos países. El alcohol es la sustancia de abuso más común en la civilización

2121

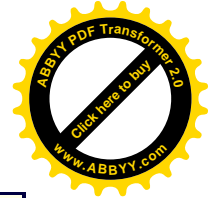


occidental, y los patrones de comportamiento con alcohol son comunes a otras drogas como la marihuana ("marijuana"), cocaína, opiáceos, benzodiazepinas y otros agentes que pueden ser inhalados, como los pegamentos y algunos derivados de hidrocarburos (gasolina). El término *adicción* es definido como el uso compulsivo de un agente químico psicoactivo, que causa problemas en la vida del individuo a nivel físico, psicológico o sociocultural. Las defensas psicológicas inconscientes contra las consecuencias de la adicción, como la negación, son una característica común que distorsiona el conocimiento del adicto hacia sí mismo, y confunde a la gente que lo rodea. La adicción es un proceso de deterioro crónico que lleva a la muerte o a la institucionalización si no se consigue controlarlo. La abstinencia del agente adictivo permite a la mente y al cuerpo recuperarse lo suficiente como para poder trabajar sobre las deficiencias de carácter social y las deterioradas relaciones con el entorno, hayan sido éstas resultantes del proceso de adicción o previas al mismo.

El Proceso de Adicción

Es importante entender que el uso de alcohol y drogas no constituye por sí mismo una adicción. Por ejemplo, en adolescentes entre 12 y 17 años de edad, aproximadamente 50 % ha probado alcohol, 15 % marihuana, y menos que 3 % cocaína.^{ref(2036)} Si se examina en el mismo grupo etario el uso reciente de drogas, los porcentajes disminuyen considerablemente: solamente 25 % ha consumido alcohol, 5 % marihuana y 0.6 % cocaína en el mes previo. Dado que la adicción implica necesariamente el consumo frecuente de drogas, está claro que no todos los que las hayan usado son adictos a las mismas.

La historia usual de la adicción comienza con un período inicial en el cual el paciente aprende que la droga produce un efecto,^{ref(2037)} lo que a menudo es descrito como *refuerzo positivo*. Es más que probable que los efectos deseables de las drogas estén relacionados a la estimulación fisiológica de receptores cerebrales. Por ejemplo, los efectos euforizantes y estimulantes de la cocaína son probablemente causados por la estimulación de áreas específicas del cerebro, áreas que también son afectadas por los opiáceos. Este estadio temprano a menudo ocurre durante una fase de experimentación y aceptación de riesgo en la vida de una persona joven que desea probar nuevas experiencias, y es seguido por un estado intermedio en el cual se manifiesta la tolerancia. El término *tolerancia* es usado para describir el requerimiento de cada vez mayores cantidades de droga para alcanzar los niveles psicológicos y fisiológicos deseados. La tolerancia implica el uso de grandes cantidades de droga sin efectos tóxicos. En ese estadio intermedio, junto con algunas consecuencias negativas del abuso de drogas, aparece como fenómeno secundario el dolor de tipo psicológico, que se intensifica por síntomas tales como agitación, nerviosismo y ansiedad, que comienzan a manifestarse como resultado del incremento en el uso de drogas. El último estadio de la adicción comienza cuando el individuo consume drogas para sentirse normal, lo que ocurre porque existe tolerancia al refuerzo positivo de la droga y porque se incrementa el *refuerzo negativo*. Este último puede incluir mala salud, pérdida de trabajo o amistades, como así también sufrimiento y molestias por la retirada de la droga. Por ello, el refuerzo negativo anima al adicto a continuar su consumo. La discontinuidad lleva a una profundización de la experiencia de dolor, haciendo que el adicto retorne a la droga para sentirse mejor. Este es el epitome del ciclo adictivo. En las últimas dos fases, el adicto pierde



la capacidad para regular la cantidad de droga consumida una vez que el consumo ha comenzado. Esta situación se denomina *pérdida de control*. No sólo el uso de la droga queda fuera de control, sino también el funcionamiento de la familia y la conducta del adicto.

La psicología de la negación es parte de la adicción.^{ref(2038)} Todo individuo intenta comportarse de una manera particular, existiendo una variedad de intenciones culturalmente determinadas que definen lo que llamamos *conducta*. Los componentes químicos de las drogas alteran esa conducta de una manera tal que algunas personas se comportan de forma diferente a lo que ellas intentan hacerlo, y también diferente a lo que culturalmente se acepta como apropiado. La discrepancia entre la conducta que se intenta y la que aparece realmente puede ser explicada utilizando diversas excusas y coartadas. La explicación de esta discrepancia de conductas se llama *negación*. El individuo afectado quiere creer en la negación para evitar el dolor de reconocer la conducta no pretendida. Progresivamente se compromete más en su negación como una manera de comprender su entorno. En otras palabras, dado que el resto del mundo reacciona desfavorablemente a su conducta, la negación se convierte en un método para racionalizar esa conducta. Varios modelos de tratamiento incluyen la ruptura de la negación de manera tal que la persona pueda ver su conducta real, lo que la lleva a una fuerte toma de conciencia del dolor y es una motivación para suprimir el uso de drogas. Se ha sugerido que el dolor es la motivación para no continuar consumiendo droga. Debido a que las consecuencias negativas del abuso de drogas aparecen tardíamente, el individuo que abusa de una droga puede convertirse en adicto antes de que esas consecuencias puedan tener un efecto inhibitorio. Parte de la última etapa del proceso de adicción es el síndrome de retirada, fase que refuerza el abuso de la sustancia. Un listado parcial de síntomas de retirada observados con algunas sustancias de abuso se presentan en la Tabla 52-1.

Otro aspecto importante de la adicción es la compulsión, intenso y desesperado deseo de utilizar alguna droga. Hay quienes no llegan a sufrirlo, pero la mayoría de las veces puede ocurrir cuando el individuo se enfrenta a situaciones que le recuerdan el uso previo de drogas o cuando su particular estado de ánimo actúa como disparador de la urgente necesidad de consumir para sentirse mejor.

Teorías para Explicar la Adicción

Varios modelos han sido propuestos para explicar el proceso de adicción. Todos coinciden en observar la alta afinidad por alcohol y drogas presentada por el adicto, como así también las grandes cantidades consumidas. Los modelos difieren en cómo tratan de explicar el progreso del individuo en su camino descendente hacia la adicción e interpretar, una vez alcanzado, el estado final de adicto. Dado que cada teoría se basa en relaciones causa-efecto diferentes, cada una de ellas sugiere también diferentes tipos de intervenciones en el tratamiento. El *concepto de enfermedad* propone que las adicciones tienen su raíz en una vulnerabilidad biológica que predispone al individuo a la tolerancia y a la pérdida de control.^{ref(2039)} Esta hipótesis sugiere que la abstinencia es la única solución, y el tratamiento se dirige específicamente a la realización de esta pérdida de control. El *modelo cognoscitivo/conductual* de la adicción sugiere que los adictos poseen distintas expectativas respecto de su uso de alcohol y drogas, y quedan atrapados dentro de un patrón de consumo debido a un

refuerzo positivo (se sienten bien socialmente, eufóricos y menos tensos), y a otros refuerzos negativos (síntomas de la fase de retirada después de la supresión de la droga).^{ref(2040)} En este modelo el tratamiento aspira a proveer las habilidades alternativas necesarias para ayudar al individuo a resolver sus problemas, mediante recursos dirigidos hacia el sentimiento de auto-eficacia. La hipótesis de la auto-medicación enfatiza la motivación psicológica para beber alcohol o consumir drogas con el objeto de alterar un estado emocional de infelicidad.^{ref(2041)} El tratamiento se focaliza en este estado emocional para hacerlo menos doloroso, y por lo tanto, disminuir la motivación del individuo para el uso de alcohol y drogas.

Prevalencia de la Adicción en Diferentes Grupos

La prevalencia del consumo de alcohol y drogas puede ser categorizada en función de la edad y el sexo. El primer contacto ocurre usualmente entre los 16 y 20 años de edad, mientras que el pico de uso para alcohol y drogas se alcanza en el grupo entre 18 y 25 años de edad,^{ref(2042)} edad después de la cual la gente disminuye el consumo de alcohol y drogas ilegales. Sin embargo, es inusual que sea tan uniforme el patrón de inicio temprano en la bebida y en el consumo de drogas, por lo que el último grupo bien podría continuar dentro del ciclo de adicción. Además, el fuerte consumo de alcohol y drogas después de los 25 años debe ser considerado como indicador potencial de adicción. En el grupo etario entre 18 y 25 años, se requiere estudiar cuidadosamente los patrones de conducta y otros indicadores de adicción para diferenciar al adicto o potencial consumidor de drogas del resto de la población. La Tabla 52-2 describe el consumo de alcohol y drogas en distintos grupos etarios. Puede observarse que el mayor consumo de alcohol ocurre en el grupo entre los 18 y 25 años de edad, y disminuye para el siguiente grupo entre los 26 y 34 años. En cuanto a diferencia de sexo, es cinco veces más probable que el varón se convierta en un fuerte bebedor. También existen diferencias sociales y culturales. Por ejemplo, es sorprendente el hecho que la población de origen europeo de los Estados Unidos tiene un índice de consumo de tabaco mayor que las poblaciones afroamericana e hispánica del mismo país. Aunque el uso de cocaína en los Estados Unidos siempre ha recibido gran atención por parte de los medios de comunicación, en la actualidad su consumo real está por debajo del 3 %. El consumo de cocaína ha estado históricamente relacionado a una población adulta, usualmente entre 25 y 40 años, aunque actualmente existe un cambio dirigido hacia la población adolescente, probablemente el grupo más proclive a experimentar el uso de drogas. La secuencia del abuso de alcohol y drogas sigue habitualmente un patrón particular.^{ref} Los adolescentes varones usualmente consumen alcohol y tabaco antes que marihuana, mientras que las mujeres consumen alcohol o tabaco, no ambos, antes de probar la marihuana. Esta última a menudo precede el uso de otras drogas ilegales. Así, drogas ilegales altamente adictivas son precedidas por sustancias legales menos adictivas. El consumo de drogas legales es un comienzo necesario en el proceso de adicción que tiene que ver con la buena voluntad o el compromiso de la persona para con el uso de alcohol y drogas. Es posible que estas llamadas “drogas de entrada” sensibilicen ciertas áreas del cerebro. Otras hipótesis señalan que las drogas legales inician al individuo en el camino psicológico hacia la negación, adecuándolo al uso de otras drogas.

El abuso y el mal uso de las drogas prescritas es un problema común y complejo,



responsable de cerca del 60 % de los casos relacionados con drogas que acuden a salas de emergencia, y del 70 % de las muertes asociadas al uso de drogas.^{ref(2044)} El abuso de drogas de prescripción incluye a aquellas desviadas hacia propósitos de adicción (tanto para venta como para consumo) por el médico o por el paciente, además de los casos de sobredosis. Se refiere también a los pacientes que inadvertidamente se convierten en adictos tomando la medicación aún de la forma que les fue prescrita, o a aquellos que se automedican consiguiendo la medicación en la calle o a través de un familiar o amigo. Los alcohólicos y los viejos son grupos particularmente propensos al abuso de drogas de prescripción médica cuando sufren dolor, insomnio, ansiedad o depresión.

El adicto o el consumidor puede usar más de una droga.^{ref(2045)} Aproximadamente la mitad de los alcohólicos son también dependientes de alguna otra droga ilegal, mientras que del 80 % al 95 % son fumadores habituales, lo que triplica el promedio nacional de los Estados Unidos. En el caso de pacientes que reciben metadona, al menos el 50 % de ellos son alcohol dependientes. En individuos dependientes de alcohol o cocaína, muy a menudo se encuentran otras drogas. Por ello, quien es positivo para alguna sustancia ilegal, muy probablemente también será positivo para alcohol o marihuana.

Fisiopatología del Abuso Crónico de Sustancias

Diversas formas de daño orgánico aparecen en algunas enfermedades como secuela del uso crónico.^{ref(2046)} El ejemplo más común es el daño hepático y la cirrosis alcohólica provocados por la alcohol dependencia. La Tabla 52-3 presenta algunos problemas médicos asociados con el abuso crónico.^{refs(2047)} Además, a menudo se observa daño directo al sistema nervioso central en individuos que inhalan derivados del petróleo (gasolina) o pegamento. La cocaína y el alcohol pueden también afectar al feto.^{ref(2048)} Los neonatos expuestos a la cocaína suelen ser prematuros, pudiendo ser de naturaleza inquieta y difíciles de manejar al principio. Ha sido reportado daño intrauterino cuando los efectos vasculares de la cocaína causan una pérdida local del flujo de sangre hacia la placenta, lo que puede provocar un ataque o un daño orgánico al feto. Los efectos a largo plazo de la exposición intrauterina a cocaína, en términos de defectos orgánicos o fallas en la inteligencia, no son conocidos hasta ahora. El *síndrome fetal por alcohol* se caracteriza por retardo mental, retardo en el crecimiento y una variedad de anomalías craneofaciales. Cuando crecen, estos niños presentan problemas de atención y carencias de ciertas habilidades sociales, que provocan una pobre performance escolar si no reciben cuidados especiales. Se cree que existe una forma menos severa de este síndrome, llamada efecto fetal por alcohol, que afecta a una mayor cantidad de niños, aunque por la sutileza del deterioro neurológico es difícil de precisar el número de individuos afectados.

Diagnóstico de la Adicción y del Abuso de Sustancias

El diagnóstico de una adicción puede resultar difícil porque el uso de alcohol y drogas frecuentemente mimetiza otros síndromes de tipo psiquiátrico. Una historia de consumo de



alcohol es un importante hallazgo diagnóstico. Sin embargo, la presencia de la negación es común y a menudo confunde al médico, y si la historia de consumo de alcohol y drogas no es admitida por el paciente, puede llevarlo a un diagnóstico erróneo. La coexistencia de enfermedad mental y dependencia a una sustancia psicoactiva se considera bastante común: 30 % a 40 % de la población adicta a alcohol y drogas presenta un diagnóstico psiquiátrico comórbido.^{ref(2049)} A su vez, debe realizarse un diagnóstico diferencial para problemas psiquiátricos del tipo de la depresión o la manía, que requieren ser diferenciados de otras condiciones médicas que pueden mimetizar estos desordenes, como la enfermedad tiroidea y la enfermedad de Wilson, entre otras.

Se cree que el alcoholismo puede ser heredado, por lo que una historia de alcoholismo en la familia del paciente involucra a éste dentro de un grupo de alto riesgo a la dependencia de alcohol y drogas.^{ref(2050)}

Es importante la observación de los síntomas de la fase de retirada, que cuando están presentes tienen carácter diagnóstico. Por otro lado, muchos individuos son alcohol y droga dependientes sin presentar los síntomas característicos de retirada. Son psicológicamente dependientes y caen dentro del estadio intermedio del proceso de adicción. Pese a que la negación y las amnesias temporarias son fenómenos importantes para ser entendidos, no son considerados evidencia diagnóstica de adicción. Las *amnesias temporarias* son episodios de verdadera amnesia que están habitualmente asociados a la dependencia alcohólica o a la dependencia a sedantes o hipnóticos. Pero a pesar de que no constituyen criterio de significación diagnóstica, son altamente sugestivos de dependencia. La *negación* es la más común de las defensas psicológicas del individuo, y es utilizada por el adicto y por el alcohólico con el objeto de prevenir el reconocimiento consciente de su adicción, que desvía el miedo a la pérdida de control. La negación solamente puede ser reconocida como tal luego de haber identificado la adicción, razón por la cual no puede ser considerada como un criterio diagnóstico.

El diagnóstico y tratamiento del abuso de las drogas de prescripción médica depende de saber reconocer lo que realmente ocurre en cada caso. La solicitud de prescripciones por falta de medicación antes de la fecha estimada, puede ser un signo de adicción por parte del propio paciente, o una sospecha de su posterior comercialización a otras personas. El uso diario de una medicación, predominantemente sedativos o narcóticos, cuando se transforma en un hábito, es el inicio de una dependencia física y de los síntomas de retirada que aparecen cuando se discontinúa en forma brusca su administración. Repetidas visitas a distintos médicos pueden ser signo de un comportamiento que procura obtener alguna droga o una oportunidad para una inadvertida sobremedicación. Cada una de estas diferentes situaciones debe ser manejada de distinta forma dependiendo de cada paciente y de cada médico en particular. Los métodos de tamizaje para drogas pueden ser cruciales para confirmar que el paciente está utilizando una droga no prescrita por el médico, o lo está haciendo más allá de la fecha indicada. Un análisis cuantitativo puede ser útil cuando aún sabiendo qué droga debe estar presente, está cuestionada la cantidad estimada de la misma. Esta situación ocurre cuando se sospecha que el propio paciente está incrementando la dosis, u obteniendo medicación a partir de prescripciones subrepticamente solicitadas a otros médicos.

En general, y a menudo como consecuencia de la negación, más del 50 % de los alcohólicos cuentan historias que merecen poca confianza. Estas historias increíbles son en parte debidas al alto grado de estigmatización que tienen los alcohólicos y los adictos: los



individuos que padecen estos desordenes terminan acostumbrándose a un considerable retrocontrol negativo y enmascaran su incapacidad hasta que se sienten seguros para admitirla. Los criterios para el diagnóstico de abuso de sustancias que aparecen en la Tabla 52-4 son fundamentalmente subjetivos y por ello más difíciles de aplicar.

Los intentos para utilizar datos cuantitativos de laboratorio frecuentemente alcanzan un éxito relativo. La combinación de tests que incluye a gama-glutamyl transferasa, volumen corpuscular medio y aspartato aminotransferasa, puede tener una sensibilidad diagnóstica y especificidad para alcoholismo del orden del 70 % al 95 %. Un tamizaje positivo para drogas no es diagnóstico de adicción. El consumo de alcohol y drogas es un fenómeno común en los Estados Unidos en la década de los 90s. Un tamizaje positivo para drogas solamente indica que las sustancias detectadas fueron consumidas dentro de un cierto período de tiempo previo a la toma de muestra de los fluidos corporales. Obviamente un informe positivo para drogas es un hallazgo importante, pero el médico debe realizar el diagnóstico final sobre la base de la historia particular del individuo, su estado clínico y la observación de signos y síntomas característicos de adicción, especialmente cuando pueden aparecer serias consecuencias de tipo legal en el futuro.

El Proceso de Tratamiento

El mayor obstáculo para el tratamiento de la adicción a drogas es la continua negación del paciente.^{ref(2051)} Aún el monitoreo ordenado por una decisión de la Corte puede no eliminar la negación, y así puede fracasar el tratamiento. La mayor parte del proceso de tratamiento consiste en incrementar en el individuo la toma de conciencia de su propio problema, con el objeto de aumentar su motivación por el tratamiento y despertar su cooperación.^{ref(2052)} Las familias pueden colaborar para obtener el compromiso del paciente, y la coerción externa, de la Corte por ejemplo, también ayuda para retener al paciente bajo tratamiento. Cuando el adicto aprecia que el consumo de alcohol y drogas está fuera de control y esto hace inmanejable su vida, es más probable que se comprometa en algún programa de abstinencia. Junto con la promesa de abstinencia aparece una mayor cooperación por parte del paciente para revertir los problemas de su adicción. Estos programas de rehabilitación intentan reconstruir los sectores de la vida del adicto que han sido subdesarrollados o debilitados por la adicción. Se debe recobrar la ayuda espiritual y hacer grandes esfuerzos para prevenir la recaída, explorando los factores disparadores de la misma, y evitando situaciones que puedan precipitarla. La prevención de la recaída depende del descubrimiento de mecanismos alternativos no relacionados con la droga para resolver los problemas de la vida del adicto.

Los programas para detener el ciclo de la adicción tienen considerable éxito tanto en pacientes internados como en pacientes ambulatorios, y aunque muchos retornan al consumo, vale la pena repetir una y otra vez los esforzados intentos para dejar de consumir. Más de la mitad, aproximadamente entre 50 % y 80 %, de los pacientes que completaron su tratamiento permanecen en abstinencia por lo menos por un año.

Las estrategias de rehabilitación comprenden el uso de pactos y tamizajes de drogas. Bajo esta circunstancia, el adicto se compromete a seguir una serie de etapas de rehabilitación, que pueden incluir su concurrencia a reuniones de asociaciones del tipo de Alcohólicos



Anónimos. En general, el acuerdo especifica que si la persona abandona prematuramente el tratamiento, o si se encuentra que ha consumido droga, hecho comprobado por narración o detección por tamizaje, tendrá algunas consecuencias como la alteración de su régimen de libertad condicional o vigilada, la pérdida de su trabajo, o la finalización del tratamiento.

Los métodos de tamizaje de drogas son un componente común de los pactos de rehabilitación. Habitualmente son solicitados semanalmente, pero pueden realizarse con mayor frecuencia. El tratamiento en pacientes ambulatorios utiliza los métodos de tamizaje sobre la base de la necesidad del requerimiento. Los perfiles habituales incluyen al grupo de drogas de abuso más comúnmente consumidas, pero pueden añadirse otras si existe un interés específico en su detección. La medicación de detoxificación frecuentemente arroja un resultado de tamizaje positivo, del mismo modo que los analgésicos narcóticos, ciertos anticonvulsivantes y las drogas hipnóticas prescritas para el insomnio. Dado que los adictos a menudo se quejan de trastornos somáticos y demandan estas medicaciones a sus médicos sin necesitarlas, es importante que el médico posea la suficiente experiencia en adicciones para evaluar un resultado de tamizaje positivo en relación a la medicación que los adictos reclaman necesitar. La información obtenida se usa para confrontarla con la proporcionada por el adicto si se sospecha un consumo subrepticio de la droga, con el objeto de brindarle una oportunidad de evitar una recaída temprana antes que se produzca un perjuicio mayor.

Tamizaje de Drogas Prelaboral o Aleatorizado

En el examen prelaboral muchos empleadores utilizan el método de tamizaje para drogas a fin de identificar a aquellos potenciales empleados que podrían constituir un riesgo para la empresa. El riesgo incluye el peligro de un accidente de trabajo sufrido en forma personal o provocado a otros compañeros, como así también la inconveniencia de incorporar un empleado adicto dado los altos costos de la seguridad social para este tipo de adicciones.^{[ref\(2053\)](#)} Dependiendo de cada situación particular, son varias las sustancias que se investigan en los métodos de tamizaje prelaboral. En algunos programas se mide incluso el alcohol en orina. En los Estados Unidos, existe una ley que obliga a los empleados del Gobierno Federal o del Departamento de Transporte a ser examinados para aquellas drogas especificadas por S.A.M.H.S.A. (Substance Abuse Mental Health Service Administration), organismo previamente llamado N.I.D.A. (National Institute of Drug Abuse). El panel obligatorio incluye cinco drogas: opiáceos, cocaína, barbituratos, marihuana y fenciclidina. Existen empresas, que no sólo incluyen el análisis de drogas ilegales en el examen prelaboral, sino que también se lo realizan a los individuos previamente empleados. El número de empresas que adoptan este tipo de programas va en constante aumento. Los estudios son denominados “por causa”, debido a que son originados por acciones que llevan a la sospecha de abuso de drogas. Se efectúan sobre una base de periodicidad preestablecida o directamente al azar.

El propósito de los métodos de tamizaje es el mismo tanto cuando se realizan en empleados dentro de la empresa como cuando son parte de un examen de ingreso prelaboral. Los *tamizajes de drogas aleatorizados* son utilizados para aumentar la probabilidad de detectar individuos que consumen drogas ilegales. Para el caso de empleados de servicios de transporte, es usualmente especificado el tiempo y el lugar del estudio, mientras que para otros



grupos como las fuerzas armadas, el tamizaje se realiza al azar.

Por que Fallan los Pacientes en el Cumplimiento del Tamizaje de Drogas

Aún aquellos individuos que saben de antemano que serán examinados en un programa de tamizaje para drogas pueden fracasar en el mismo. Para interpretar este hecho se han intentado varias explicaciones: (i) el individuo no entiende los aspectos fisiológicos del método: desconoce el concepto de vida media de una droga, y por lo tanto no aprecia el tiempo que una sustancia puede permanecer detectable en sangre y orina después de su último uso. (ii) puede ocurrir que el individuo a examinar se encuentre en pleno proceso de negación respecto de su adicción, y por lo tanto no entiende que lo que se pretende detectar es la droga en su propio organismo y no en *el* de otra persona. Razona asumiendo que el programa de detección tiene como objetivo encontrar adictos, y dado que él no lo es, no tendrá inconveniente alguno. (iii) finalmente, el individuo adicto puede no tener la intención de consumir drogas porque sabe que en algún momento se le efectuará la prueba, sin embargo, la pérdida de control puede inducirlo al consumo en el momento menos oportuno.

La pérdida de control puede visualizarse de distintas maneras: Una de ellas implica que el consumo de drogas puede ser un mecanismo para enfrentar la angustia. Como el método de tamizaje es por sí mismo un factor de presión psicológica, consume drogas en un intento de enfrentar la tensión añadida a la situación. El consumo también puede darse de una forma impulsiva cuando existe el deseo desesperado y la necesidad urgente de consumir, inclusive en momentos previos al examen.

Los individuos pueden intentar no consumir droga, pero fracasan debido a su incapacidad para rechazarla cuando se les ofrece la misma en determinados ambientes, por ejemplo, si participa de una fiesta justo antes de la realización del tamizaje. También la pérdida de control puede ocurrir cuando se experimentan los síntomas de retirada: el individuo se siente obligado a consumir drogas para aliviar dichos síntomas. Las posibles razones de orden psicológico por las cuales un individuo puede fracasar en un examen para drogas tienen que ver con la culpa y son obra del inconsciente en ciertos individuos neuróticos.

Otro importante factor a tener en cuenta es que algunas drogas de prescripción médica pueden arrojar un resultado positivo en los métodos de tamizaje. Por ello, todo resultado obtenido a partir de esta metodología debe ser analizado cuidadosamente por un médico con experiencia en el tema, denominado *Médico Revisor Oficial* ("Medical Review Officer" o M.R.O., sigla que paulatinamente se ha ido imponiendo en nuestro idioma para definir esta función particular), quien es capaz de interpretar el informe positivo del tamizaje a la luz de la historia previa del paciente. Esto es particularmente importante cuando se está trabajando en un ambiente donde pueden aplicarse sanciones disciplinarias o llevarse a cabo acciones de tipo legal. El M.R.O. debe establecer y certificar si el resultado positivo fue debido a una droga de prescripción médica, a algún otro tipo de agente como las semillas de amapola, o realmente a un consumo de drogas ilegales.

Cambio del Compuesto Anilazido en la Enfermedad



El método de tamizaje para drogas frecuentemente se utiliza como un componente más de los procesos de diagnóstico y tratamiento, y para comprender su significado se sugiere ver el Capítulo 51. En general, se solicita una muestra de orina fresca obtenida al azar, salvo cuando ocurren ciertos cambios en la conducta del paciente, o alguna otra causa que requiera intervalos específicos de recolección. Los métodos de tamizaje pueden utilizarse de distinta manera en los programas de tratamiento de adicciones. La identificación de la droga consumida es una importante función de estos métodos, debido fundamentalmente a la poca confiabilidad y a la falta de veracidad que pueden provenir de la historia particular de consumo de alcohol y drogas referida por el propio paciente. A pesar de que el propósito principal es identificar el abuso a alcohol y drogas, los datos obtenidos también pueden ser críticos en la confrontación con la activa negación que presentan estos pacientes. Basándose en lo anterior, las drogas que son analizadas incluyen alcohol, cocaína, marihuana y opiáceos entre otras. Debe tenerse en cuenta que algunos agentes como el LSD (ácido lisérgico), debido a la tecnología hoy existente, no pueden ser incluidos en los actuales métodos de tamizaje.

El tamizaje de drogas es una herramienta muy poderosa para reforzar los pactos o acuerdos de rehabilitación que explícitamente requieren la abstinencia a determinadas drogas. Sin ellos, los pactos carecerían de un elemento coercitivo importante. Los programas de prevención de recaídas utilizan los métodos de tamizaje para monitorear la abstinencia en curso: el paciente comprometido con este tipo de programas se ha propuesto no consumir, pero está demostrado que el deseo compulsivo hacia algunas drogas como la nicotina o la cocaína pueden romper el compromiso asumido. Finalmente, el tamizaje de drogas es un requerimiento legal para aquellos pacientes que siguen un programa de tratamiento de mantenimiento con metadona, en los que los resultados obtenidos son frecuentemente utilizados para determinar las futuras dosis de metadona. Si el paciente continúa consumiendo opiáceos además de la metadona prescrita, se modifica la dosis de esta última con el objeto de inducirlo a que discontinúe el uso ilegal de opiáceos. Dependiendo del programa de tamizaje, las drogas a examinar pueden ser un grupo de drogas o simplemente una, como el alcohol. Hay que destacar que muchos adictos son consumidores de varias drogas a la vez, y que esta información es de suma importancia para el uso e interpretación de los métodos de tamizaje.

Un componente importante de estos métodos puede ser la necesidad de la confirmación del resultado positivo (ver pág. 1026). Los resultados positivos obtenidos en programas de rehabilitación pueden o no necesitar ser confirmados, pero en el ámbito laboral siempre debe ser confirmado todo resultado positivo para drogas obtenido por un programa de tamizaje.

Referencias

1. National Institute on Drug Abuse: *National household survey on drug abuse: main findings 1990*, Rockville, Md., 1991, U.S. Department of Health and Human Services.
2. Johnson VE: *Intervention: how to help someone who doesn't want help*, Minneapolis, 1986, Johnson Institute Books.
3. Goldsmith RJ, Warner A, Hassan FM: Substance abuse testing, *In-service Training and Continuing Education* 11:7-13, 1989.
4. Meyer RE, Babor TF: Explanatory models of alcoholism. In Tasman A, Hales RE, Frances AJ, editors:

Review of psychiatry, vol. 8, Washington, D.C., 1989, American Psychiatric Press.

5. Goldsmith RJ. An integrated psychology for the addictions: beyond the self-medication hypothesis, *J Addict Dis* 12:137-152, 1993.
6. Yamaguchi K, Kandel DB: Patterns of drug use from adolescence to young adulthood: II. Sequences of progression, *Am J Public Health* 74:668-672, 1984.
7. Weiss KJ, Greenfield DP: Prescription drug abuse, *Psychiatr Clin North Am* 9:475-490, 1986.
8. Chan AWK: Multiple drug use in drug and alcohol addiction. In Miller NS, editor: *Comprehensive handbook of drug and alcohol addiction*, New York, 1991, Marcel Dekker.
9. Benzer DG: Medical consequences of alcohol addiction. In Miller NS, editor: *Comprehensive handbook of drug and alcohol addiction*, New York, 1991, Marcel Dekker.
10. Engel CJ, Benzer DG: Medical complications of drug addiction. In Miller NS, editor: *Comprehensive handbook of drug and alcohol addiction*, New York, 1991, Marcel Dekker.
11. Geller A: Neurological effects of drug and alcohol addiction. In Miller NS, editor: *Comprehensive handbook of drug and alcohol addiction*, New York, 1991, Marcel Dekker.
12. Regier DA, Farmer ME, Rae DS, et al: Comorbidity of mental disorders with alcohol and other drug abuse, *JAMA* 264:2511-2518, 1990.
13. Kosten TA, Kosten TR: Criteria for diagnosis. In Miller NS, editor: *Comprehensive handbook of drug and alcohol addiction*, New York, 1991, Marcel Dekker.
14. Schuckit MA: Biological vulnerability to alcoholism. In Miller NS, editor: *Comprehensive handbook of drug and alcohol addiction*, New York, 1991, Marcel Dekker.
15. Chan AWK: Biochemical markers for alcoholism. In Miller NS, editor: *Comprehensive handbook of drug and alcohol addiction*, New York, 1991, Marcel Dekker.
16. Tiebout H: The problem of gaining cooperation from the alcoholic patient. *Q J Study Alcohol* 8:47-54, 1947-1948.
17. Engelhart P, Robinson H, Carpenter HD: The workplace. In Lowinson JH, Ruiz P, Millman RB, Langrod JG, editors: *Substance abuse: a comprehensive textbook*, Baltimore, 1992, Williams & Wilkins.

Tablas

Tabla 52-1. Síntomas de retirada.

Alcohol y sedantes	Tabaco	Estimulantes y cocaína	Opiáceos	Cafeína	Marihuana
Temblor	Compulsión	Somnolencia	Lagrimo	Compulsión	Irritabilidad
Náusea	Irritabilidad	o hipersomnia	Rinorrea	Dolor de cabeza	Pérdida de apetito
Vómitos	Ansiedad	Hiperfagia	Dilatación de pupilas	Somnolencia	Insomnio
Taquicardia	Dificultad de concentración	Humor depresivo (± suicida)	Piloerección	Irritabilidad	
Sudoración	Desvelo		Sudoración		
Elevada presión sanguínea	Dolor de cabeza		Diarrea		
Ansiedad	Letargo		Bostezo		
Irritabilidad	Disturbios gastrointestinales		Hipertensión suave		
Humor depresivo			Taquicardia		
Hipotensión ortostática a			Fiebre		
			Insomnio		
			Síndrome gripal inespecífico con mialgias		

Tabla 52-2. Prevalencia del uso de drogas (porcentaje de la población).

Varones	Alcohol *	Tabaco	Marihuana	Cocaína
12 – 17	2-3 %	12 %	?	1 %
18 – 25	11 %	30 %	13%	2%
26 – 34	7 %	30 %	8.6 %	1.7 %
>34	2-3 %	24 %	2 %	0.2 %

* Los grandes bebedores son aquellos que toman cinco o más bebidas por vez, en cinco o más días durante los treinta días previos.

Tabla 52-3. Ejemplos de fisiopatología médica asociada con abuso.

Substancia	Enfermedad	
Alcohol	Cirrosis hepática Síndrome fetal por alcohol Cáncer gastrointestinal	Cardiomiopatía Traumas de todo tipo Ataques Depresión
Cocaína	Perforación del septum nasal Convulsiones Paranoia Fase de retirada en neonatos	Paro cardíaco Ataques de pánico Nacimientos prematuros
Opiáceos	Infecciones, SIDA Autointoxicación	Hepatitis Fase de retirada en neonatos
Tabaco	Enfisema Ataque cardíaco Bajo peso al nacer	Cáncer de varios tipos Osteoporosis

* En adición a los síntomas de la fase de retirada

Tabla 52 – 4. Criterios diagnósticos de adicción.

Tolerancia
Pérdida de control
Limitaciones en el estilo de vida



Consumo a pesar de las razones para no
consumir
Síntomas de retirada

CAPÍTULO 53

53. Clasificación y Descripción de Proteínas, Lípidos y Carbohidratos.

Lawrence A. Kaplan

Herbert K. Naito

Parte I: PROTEÍNAS

Definición y clasificación

Propiedades químicas

Propiedades físicas

Propiedades biológicas

Parte II: LIPIDOS

Definición y clasificación

Propiedades químicas y físicas

Parte III: CARBOHIDRATOS

Definición y clasificación

Propiedades químicas

Propiedades físicas

Propiedades biológicas

OBJETIVOS

- ♦ Describir como se clasifican las proteínas.
- ♦ Listar las características químicas propias de las proteínas.
- ♦ Remarcar algunas de las propiedades biológicas de las proteínas.
- ♦ Describir como se clasifican los lípidos.
- ♦ Remarcar alguna de las propiedades biológicas de los lípidos y su localización en tejidos específicos.
- ♦ Describir como se clasifican los hidratos de carbono.
- ♦ Entender como las propiedades físicas y químicas de los carbohidratos se relacionan con sus propiedades biológicas.



Términos Clave

aldosa Forma química de monosacárido en la cual el grupo carbonilo es un aldehído.

apoproteína Cadena polipeptídica aún no complejada a su grupo prostético.

carbohidratos Compuestos químicos con fórmula general de hidratos de carbono, $(CH_2O)_n$, que son derivados de aldehídos y cetonas de polialcoholes. Comúnmente llamados *azúcares*.

proteínas compuestas (conjugadas) Cadena polipeptídica acomplejada con otra forma química tal como lípidos (lipoproteínas), carbohidratos (glicoproteínas), o ácidos nucleicos (nucleoproteínas).

lípidos conjugados Esteres de ácidos grasos y alcoholes que contienen estructuras químicas adicionales. Este grupo incluye fosfolípidos, esfingolípidos, esteroides, ácidos biliares, etc.

desnaturalización Desplegamiento de la estructura terciaria de una proteína que frecuentemente la torna insoluble, causando su precipitación en solución.

derivados lipídicos Lípidos derivados de la hidrólisis de grasas simples o conjugadas; incluyen los ácidos grasos.

disacárido Dos monosacáridos unidos entre sí por uniones glicosídicas 1→4 o 1→6, tales como sucrosa, maltosa o lactosa.

furanosa Anillo de cinco unidades de monosacáridos formados por reacciones intramoleculares entre el grupo carbonilo y un grupo hidroxilo; presente en formas estereoisoméricas alfa o beta.

punto isoelectrico pH al cual una molécula que contiene muchos grupos ionizables es eléctricamente neutra es decir, el número de grupos cargados positivamente iguala al número de grupos cargados negativamente.

cetosa Forma química de monosacárido en la cual el grupo carbonilo es una cetona.

monosacárido Unidad básica monomérica de carbohidrato en la cual n en la fórmula $(CH_2O)_n$ varía de 3 a 8.

unión peptídica Unión amida covalente entre grupo amino primario de un aminoácido y el grupo ácido carboxílico de un segundo aminoácido.

polisacárido Polímero que usualmente contiene más de 10 monosacáridos unidos por uniones glicosídicas; con cadenas ramificadas y no ramificadas que pueden llegar incluso a muchos millones de peso molecular, como la celulosa, el almidón o el glucógeno.

estructura primaria Secuencia lineal aminoacídica de una proteína, definida en el código genético presente en el DNA.

grupo prostético Un grupo químico no proteico que está unido a una proteína y que es responsable por la actividad biológica de la misma. El



complejo funcional entre la proteína y un grupo prostético es llamado *holoproteína*, y la proteína sin el grupo prostético es llamada *apoproteína*.

piranosa Anillo de seis unidades de carbono formado por una reacción intramolecular entre el grupo carbonilo y un grupo hidroxilo, presente en forma estereoisomérica alfa o beta.

estructura cuaternaria Arreglo tridimensional espacial de las cadenas polipeptídicas resultante de la combinación de una o más cadenas polipeptídicas en un complejo más estable de mayor tamaño.

base de Schiff Complejo covalente entre una amina primaria y la función carbonilo de una aldosa.

estructura secundaria Rearreglo espacial de una cadena lineal de aminoácidos en un polipéptido; las estructuras más comunes son la de hoja beta plegada, alfa hélice y ovillo al azar.

ácido siálico *N*-acetil derivados de ácido neuramínico que están covalentemente unidos a muchas proteínas.

Lípidos simples Esteres de ácidos grasos con varios alcoholes, incluyendo los triglicéridos y algunos esteroides.

Proteínas simples Cadena polipeptídica que sólo tiene aminoácidos.

Esteroides Lípidos que contienen cuatro anillos de seis carbonos, incluyen muchas hormonas, vitaminas y drogas.

Estructura terciaria Plegamiento intramolecular de una cadena polipeptídica sobre sí misma que resulta de interacciones entre grupos laterales de aminoácidos individuales.

zwitterion Molécula que contiene dos grupos ionizables de carga opuesta.

Este capítulo no intenta proveer una revisión bioquímica completa de los compuestos a determinar en el laboratorio químico. Para ello, se recomienda a los lectores consultar los excelentes textos de bioquímica mencionados en la bibliografía. En su lugar, se enfatizará en aquellas propiedades de proteínas, lípidos e hidratos de carbono que afecten la forma en que los compuestos deben ser medidos.

Parte I: Proteínas

Lawrence A. Kaplan

Definición y Clasificación

Las proteínas son polímeros lineales de alfa aminoácidos. Hay 20 aminoácidos naturales con una estructura general mostrada en la Fig. 53-1. Estos existen como formas estereoisoméricas-L con el grupo amino ubicado en el átomo de carbono alfa próximo al grupo carboxílico. El pK_a del grupo ácido carboxílico es, aproximadamente 1.8 a 2.4, mientras que

el pK_a del grupo alfa amino es de 8.53 a 10.53, aproximadamente. Esto significa que a un pH menor que 2.53, el ácido carboxílico estará en forma no-ionizada (COOH), mientras que el grupo alfa amino permanecerá ionizado a valores de pH menores que 9.53 (Fig. 53-2). A pH fisiológico (aproximadamente 7.4), ambos grupos están ionizados. Un compuesto, como por ejemplo un aminoácido, con dos cargas opuestas es llamado zwitterion ("ion híbrido," o "ion hermafrodita").

Los grupos laterales de los 20 aminoácidos están listados en la Tabla 53-1, junto con los pK_a de todos los grupos ionizables. Estos residuos laterales pueden interactuar unos con otros para determinar el total de propiedades químicas, físicas y biológicas de la cadena polipeptídica.

Los aminoácidos son covalentemente unidos por la maquinaria de síntesis de la célula. El orden real o la secuencia de aminoácidos en una cadena proteica está determinado en el código genético de la célula. La secuencia de información genética localizada en el DNA es transcrita en el RNA mensajero, el cuál es transcrito en una proteína en el citoplasma (Fig. 53-3). La secuencia específica para una proteína se denomina *estructura primaria*.

Los aminoácidos están unidos entre sí por uniones peptídicas. Como se observa en la Fig. 53-4, esta unión tiene una distribución espacial en tres dimensiones. La cadena lineal polipeptídica puede existir en tres conformaciones posibles, alfa hélice, hoja beta plegada y ovillo al azar (Fig. 53-5). Estas conformaciones son conocidas como estructura secundaria de la proteína.

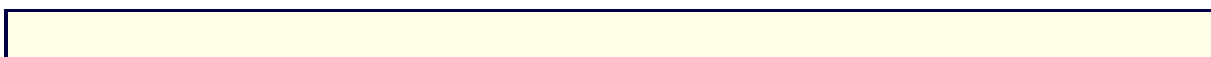
Cuando una cadena polipeptídica está en solución, es lo suficientemente flexible para doblarse permitiendo que los grupos laterales interactúen entre sí. Los tipos de interacciones están listados en la Tabla 53-2. Aunque la energía con que interactúan los grupos es pequeña, la energía neta de todas las interacciones es lo suficientemente grande como para estabilizar a las proteínas en un arreglo tridimensional espacial plegado y arrollado conocido como estructura terciaria (Fig. 53-6). La particular estructura terciaria para cada proteína le confiere sus propiedades biológicas específicas.

Las cadenas polipeptídicas plegadas con frecuencia se organizan como agregados, con polipéptidos idénticos o diferentes. El número y tipo específico de esas cadenas polipeptídicas determina las propiedades específicas del complejo. El arreglo espacial de estas proteínas multicatenarias se denomina *estructura cuaternaria* de la proteína. En general, las propiedades de estas proteínas cuaternarias es la suma de las de sus cadenas individuales.

Las proteínas por lo común se clasifican en dos grupos mayores, simples o conjugadas, con sucesivas divisiones dentro de cada grupo. Este esquema de clasificación se basa en las propiedades físicas y en la composición química de la proteína.

I. *Proteínas simples*-generalmente no asociadas con otras clases químicas más complejas

- A. Proteínas globulares-proteínas relativamente simétricas, solubles en agua o en solución salina
 - 1. Albúmina-proteína mayoritaria en suero
 - 2. Globulinas-el resto de las proteínas del suero
 - 3. Histonas-proteínas básicas, se encuentran asociadas con ácidos nucleicos
 - 4. Protaminas-proteínas fuertemente básicas



asociadas con ácidos nucleicos

- B. Proteínas fibrilares y/o proteínas asimétricas que son insolubles en agua y/o en sales diluidas; altamente resistentes a la mayoría de las enzimas proteolíticas
 - 1. Colágeno -proteína mayoritaria del tejido conectivo, con un alto contenido en hidroxiprolina
 - 2. Elastinas -se encuentran en tejidos elásticos tales como tendones y arterias
 - 3. Keratinas -proteínas mayoritarias en pelo animal, uñas, etc.
- II. *Proteínas conjugadas* -combinadas con compuestos no aminoácidos; que deben tener dos constituyentes- la proteína llamada *apoproteína*, y el grupo *prostético* no proteínico (La habilidad del grupo prostético y de la apoproteína de disociarse varía de un grupo a otro.)
 - A. Nucleoproteínas los grupos prostéticos son los ácidos nucleicos (DNA o RNA)
 - B. Mucoproteínas en las cuales grandes cantidades (mas del 4 % en peso) de carbohidratos complejos están unidos covalentemente a la proteína
 - C. Glicoproteínas -también contienen residuos de carbohidratos unidos covalentemente pero usualmente menos del 4 % en peso.
 - D. Lipoproteínas -contienen colesterol, triglicéridos y fosfolípidos asociados a proteínas altamente insolubles en agua.
 - E. Metaloproteínas -incluye proteínas que contienen metales fuertemente unidos a la proteína, tales como el hierro, o como metales complejos como las flavoproteínas y las hemoproteínas
 - F. Fosfoproteínas -contienen grandes concentraciones de grupos fosfatos covalentemente unidos a la proteína

Las funciones biológicas de las proteínas son extraordinariamente variadas, pero muchas funciones (ver adelante) son específicas para sólo una o dos de esta clase de proteínas.

Propiedades químicas

Las propiedades químicas de las proteínas están basadas en la suma de sus partes, es decir, los aminoácidos constituyentes y los grupos prostéticos. La unión peptídica es químicamente reactiva y es la base del método más específico y popular utilizado para la cuantificación de proteínas totales en suero. Esta es la reacción de Biuret. Las cadenas laterales de los aminoácidos también son químicamente reactivas, de todas formas sólo unas pocas de estas reacciones son utilizadas en el laboratorio químico. Los grupos amino en la zona N- terminal de la cadena polipeptídica y los pertenecientes a las lisinas o guanidinas de la arginina pueden reaccionar con numerosos compuestos para producir una intensa fluorescencia. Estos mismos grupos pueden reaccionar con la ninhidrina para dar color azul. Ambas reacciones han sido usadas para cuantificar proteínas totales. El grupo fenólico de la tirosina y el grupo indol del triptofano reaccionan con el reactivo de Folin-Wu o la reacción de

2137



Lowry para formar un color azul. Este método se emplea en soluciones diluidas o en microanálisis.

Propiedades Físicas

Los aminoácidos aromáticos (triptofano, fenilalanina y tirosina) le confieren a la mayoría de las proteínas un espectro de absorción con un máximo de absorbencia único en 278 a 280 nm. La absorbencia a 280 nm se usa para estimar la concentración de proteínas puras en solución. Además, proteínas complejas como la hemoglobina, que tiene un grupo prostético con propiedades únicas de absorción, puede ser cuantificada individualmente sin una extensa purificación sobre la base de su espectro de absorción específico. La banda Soret de absorción de la hemoglobina a 415 nm se usa extensivamente para cuantificar la concentración de hemoglobinas.

Las cadenas polipeptídicas tienen una amplia variación en pesos moleculares. Los polipéptidos más pequeños, tales como las endorfinas o las hormonas hipotalámicas contienen de 5 a 25 aminoácidos, mientras que las proteínas más grandes, conteniendo numerosas subunidades pueden tener peso molecular de millones de daltones. Aunque la separación de proteínas de acuerdo a su peso molecular puede hacerse, es un método rara vez usado en el laboratorio químico.

La densidad de la mayoría de las proteínas cae en un estrecho rango de 1.33 g/ml aproximadamente. Las lipoproteínas representan una importante excepción debido a que su contenido lipídico les confiere una densidad inusualmente baja, permitiendo la separación de varias clases de lipoproteínas de otras proteínas sobre la base de su densidad. Esta técnica se utiliza principalmente en laboratorios especializados.

Una propiedad física importante de las proteínas es la carga neta de la molécula proteica. La carga neta de la proteína es la suma de todas las cargas iónicas de los aminoácidos, carbohidratos y grupos prostéticos de la proteína. Ya que los diferentes grupos químicos están ionizados a valores distintos de pH, la carga neta de una proteína varía con el pH. El pH al cual una proteína no tiene carga se denomina *pI*, o *punto isoeléctrico*; el punto isoeléctrico de una proteína es el punto en el cual el número de grupos cargados positivamente iguala al número de grupos cargados negativamente. A un pH mayor que el *pI*, la proteína estará negativamente cargada, mientras que a un pH menor que el *pI* estará cargada más positivamente. A un pH fisiológico la mayoría de las proteínas séricas están cargadas negativamente.

Ya que las proteínas difieren en el tipo y número de aminoácidos constituyentes, también difieren en su *pI*. Por lo tanto a niveles de pH diferentes, las proteínas llevarán distinta carga neta. Esta diferencia en la carga neta es la base de muchos procesos para separar y cuantificar clases de proteínas o proteínas individuales. Los procesos más comunes son la electroforesis, la cromatografía de intercambio iónico y el isoelectroenfoque. Después de su separación las proteínas individuales son detectadas por el uso de tinciones específicas.

Las proteínas en los fluidos corporales son en general solubles en agua pero pueden precipitar en presencia de un amplio rango de agentes desnaturizantes o precipitantes. Estos incluyen solventes orgánicos (tales como acetona y acetonitrilo), metales pesados (tales como ácido tungstico), algunas sales (tales como hidróxido de zinc y sulfato de amonio), y ácidos



fuerres (tales como ácido sulfosalicílico, ácido tricloroacético y ácidos minerales). La habilidad de precipitar proteínas de soluciones usando uno o más de estos reactivos químicos es la base para algunos análisis clínicos de rutina. Las cuantificaciones de proteínas en líquido cefalorraquídeo y orina son hechos comúnmente por análisis turbidimétricos. Por otra parte, el paso de precipitación de la proteína frecuentemente se incluye en los esquemas de purificación de compuestos, previo a su análisis.

Propiedades Biológicas

Todas las proteínas cumplen alguna función fisiológica o biológica. Las funciones conocidas de las proteínas cubren un amplio rango de actividades y son enumeradas en la Tabla 53-3. Con frecuencia la propiedad biológica conocida de una proteína es la base de un método para su detección y cuantificación.

De las funciones fisiológicas importantes de las proteínas, las más importante para el laboratorio bioquímico son las de transporte, las de receptor, y las funciones catalíticas. Muchas proteínas séricas funcionan como transportadores específicos de moléculas pequeñas. La mayoría de las proteínas transportadoras son proteínas globulares. Son ejemplo la proteína transportadora de tiroxina (GFT), que une tiroxina; la trascortina, que une cortisol; la albúmina, que transporta ácidos grasos libres, bilirrubina no conjugada, calcio, y muchos otros compuestos endógenos y exógenos. La capacidad específica de unión de estas proteínas ha sido usada como base para los procesos de medición de concentraciones séricas de cortisol, saturación de GFT y otros compuestos analizados. Las lipoproteínas funcionan como transportadoras de lípidos en suero (ver capítulo 33).

Muchas proteínas celulares actúan como procesadores intermediarios de información para moléculas hormonales. Cada proteína, llamada *receptor*, une una hormona específica y luego actúa para transmitir el mensaje hormonal a la célula. Las proteínas receptoras son generalmente glicoproteínas. Los ensayos para receptores específicos, tales como el receptor de estradiol o progesterona, son muy importantes en el manejo de ciertos tipos de cáncer.

Una importante actividad biológica es la capacidad de algunas proteínas de catabolizar reacciones bioquímicas. Las concentraciones séricas de estas proteínas, llamadas *enzimas*, son importantes en la determinación de la naturaleza de una enfermedad. La mayoría de las proteínas que exhiben actividad catalítica son globulares o metaloproteínas. Una enzima es, la mayoría de las veces medida por el monitoreo de la reacción específica que ella cataliza. Las condiciones del ensayo enzimático son cuidadosamente definidas como para rendir una actividad enzimática máxima y por lo tanto una sensibilidad óptima al análisis (ver capítulo 54).

Una de las más importantes propiedades biológicas de las proteínas es su habilidad para actuar como antígenos (ver capítulo 11). La acción de un antígeno sobre un sistema inmunológico competente estimula la síntesis de anticuerpos del huésped. Los anticuerpos también son proteínas globulares. Un anticuerpo sintetizado contra un antígeno específico será capaz de unirse específicamente a tal antígeno. Esta interacción antígeno-anticuerpo es la base de muchos ensayos para la medición sensible y específica de proteínas que no pueden ser detectadas por otros medios debido a su baja concentración, y es usada para incrementar tanto la sensibilidad como la especificidad de los ensayos clásicos.



Las proteínas juegan un papel importante tanto a nivel intracelular, como en los tejidos. Por ejemplo, el tejido conectivo está compuesto principalmente por colágeno y mucoproteínas. Las proteínas que forman el endoesqueleto citoplasmático también entran en este grupo.

Parte II: Lípidos

Herbert K. Naito

Definición y Clasificación

Los lípidos (grasas) comprenden un amplio grupo de compuestos orgánicos que difieren considerablemente en sus propiedades químicas, físicas y en sus roles fisiológicos. Estos incluyen una variedad de sustancias como ácidos grasos, esteroides, triacilglicéridos (más comúnmente llamados *triglicéridos*), compuestos que contienen fósforo (fosfolípidos), vitaminas liposolubles, ácidos biliares, ceras y otras grasas complejas. De esta manera, resulta difícil enunciar una definición uniforme y concisa que, a su vez, sea suficientemente amplia para abarcar a todos estos compuestos diferentes. Sin embargo, en general, se puede decir que los lípidos son sustancias insolubles en agua y solubles en solventes orgánicos como alcohol, cloroformo, éter, acetona, hexano y benceno. Aún en esta definición general, hay excepciones como ser los fosfolípidos que son relativamente insolubles en acetona. Más aún, algunos fosfolípidos, como la fosfatidilcolina, el fosfatidilinositol y la fosfatidiletanolamina, presentan una habilidad limitada, pero significativa, para disolverse en agua.

Por lo tanto, no existe un acuerdo general para clasificar a los lípidos, aunque por simplicidad, se puede utilizar la siguiente clasificación comúnmente empleada.

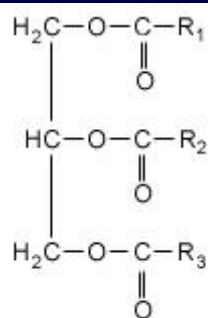
Lípidos simples

Los lípidos simples son los ésteres formados por ácidos grasos y diferentes alcoholes.

Grasas neutras.

Las grasas neutras son los ésteres formados por los ácidos grasos y el glicerol (triglicéridos). Dado que no poseen carga, el colesterol y el colesterol esterificado también son denominados *lípidos neutros*. Sin embargo, desde un punto de vista estructural, éstos son esteroideos y no grasas neutras.

Las grasas neutras contienen mezclas de triglicéridos-ésteres de glicerol y ácidos grasos (por ejemplo ácidos esteárico, palmítico u oléico). La fórmula general de estas grasas es:



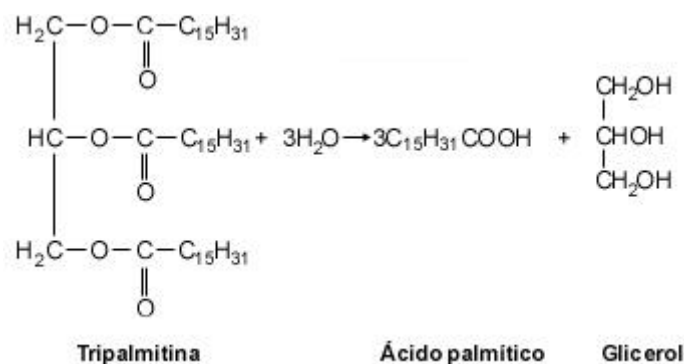
Si $\text{R}_1 = \text{R}_2 = \text{R}_3$ (donde R = ácido graso), se trata de un triglicérido simple. Si los Rs no son iguales, se trata de un triglicérido mixto. En la naturaleza, las grasas existen como mezclas de triglicéridos mixtos.

Las grasas son entonces triésteres del trialcohol (glicerol) y de algunos, pero no todos, los ácidos orgánicos. Dado que los tres radicales alcohólicos están esterificados, se los denomina *triacilglicéridos*, o más comúnmente llamados *triglicéridos*. Un éster simple estaría formado por la combinación de un ácido y un alcohol:

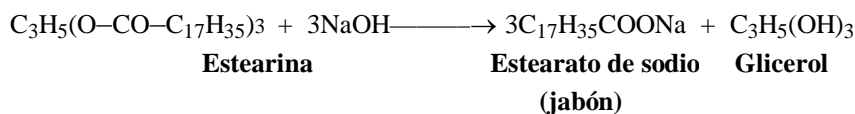


Una grasa está formada por la combinación de un ácido graso (generalmente, de peso molecular relativo elevado) con el alcohol glicerol.

Por el hecho de ser ésteres, las grasas son rápidamente hidrolizadas:



Dicha hidrólisis se lleva a cabo mediante el uso de un ácido, un álcali, vapor sobrecalentado o una enzima apropiada (como ser la lipasa pancreática). En una hidrólisis ácida, se libera el ácido graso. Cuando se emplea un álcali, se forma un jabón y el proceso es denominado *saponificación*:



Las grasas que comemos son en su mayoría triglicéridos que contienen ácidos grasos



con número par de átomos de carbono, debido a la forma en que son biosintetizados. Estos abarcan desde el ácido butírico (C_4) hasta el ácido lignocérico (C_{24}) y, probablemente, ácidos grasos mayores (ver Tabla 53-5). Los ácidos grasos con número impar de átomos de carbono también se encuentran naturalmente.

Ceras.

Las ceras son ésteres de ácidos grasos con alcoholes de mayor peso molecular que el glicerol. Ejemplos son la cera de carnauba, de lana, de abeja, y el aceite de esperma. En la industria, son utilizadas en la fabricación de lubricantes (aceite de esperma), lustradores (cera de carnauba), ungüentos (lanolina, la cual contiene cera de lana), velas (espermacetil) y otros.

Aparte del colesterol, los alcoholes comúnmente encontrados en las ceras son el alcohol cetílico ($C_{16}H_{33}OH$), alcohol cerílico ($C_{26}H_{53}OH$) y alcohol melísico ($C_{30}H_{61}OH$).

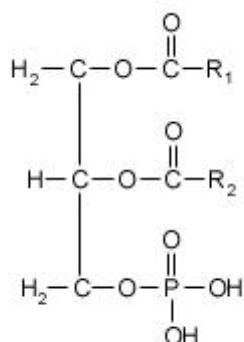
Lípidos conjugados

Los lípidos conjugados son ésteres de ácidos grasos que contienen grupos tales como un alcohol y un ácido graso (Tabla 53-4).

Fosfolípidos.

Los fosfolípidos son lípidos que, además de los ácidos grasos y el glicerol, contienen un residuo de ácido fosfórico, bases nitrogenadas y otros constituyentes. Estos lípidos incluyen a la fosfatidilcolina (lecitina), fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, fosfatidilserina, esfingomielinas y plasmalógenos. La fosfatidiletanolamina, la fosfatidilserina y el fosfatidilinositol (lipositol) también son conocidos como cefalinas.

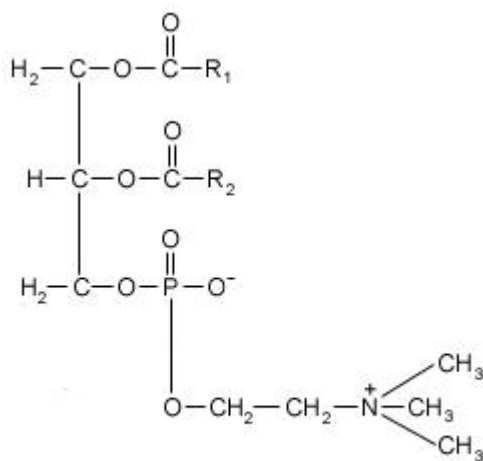
Esta clase de lípidos complejos también es llamada *glicerofosfátidos*, *fosfoglicéridos*, *fosfatidatos del glicerol*, o más comúnmente *fosfolípidos*. No todos los lípidos que contienen fósforo son fosfoglicéridos; por ejemplo, la esfingomielina es un fosfolípido porque contiene fósforo, pero se lo clasifica mejor como un esfingolípido debido a su estructura medular a la cual se une el ácido graso. En los fosfolípidos, uno de los grupos OH primarios del glicerol es esterificado por el ácido fosfórico, mientras que los otros grupos OH son esterificados por ácidos grasos. El compuesto precursor de los fosfolípidos es el ácido fosfatídico, el cual no posee la cabeza polar alcohólica. Los fosfolípidos son constituyentes de todas las células vegetales y animales. Son abundantes en cerebro, corazón, riñones, huevos, porotos de soja, entre otros. Los fosfolípidos comúnmente han sido separados en cinco grupos de compuestos diferentes: ácido fosfatídico, lecitina, cefalina, plasmalógenos y esfingolípidos. Además de carbono, hidrógeno y oxígeno, estos compuestos tienen elementos nitrogenados y fósforo. En la lecitina y la cefalina, la relación entre nitrógeno y fósforo es de 1:1; en la esfingomielina es de 2:1.



Ácido fosfatídico

Ácido fosfatídico. El ácido fosfatídico es importante como intermediario en la síntesis de triglicéridos y fosfolípidos, pero no se lo encuentra en los tejidos. Es el fosfolípido más simple y deriva del ácido glicerofosfórico por esterificación de los dos grupos OH restantes con ácidos grasos.

Lecitinas. Al ser hidrolizada, una lecitina típica forma glicerol, 2 moles de ácidos grasos, ácido fosfórico y la base nitrogenada colina. La mayoría de las lecitinas tienen un ácido graso saturado en la posición C-1 y un ácido graso insaturado en la posición C-2. La fórmula estructural puede escribirse de la siguiente manera:



**Lecitina
(fosfatidil colina)**

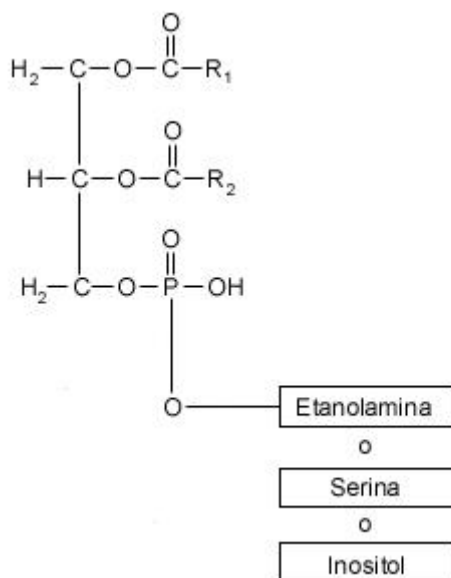
Las lecitinas, al igual que el colesterol, son constituyentes celulares comunes que se encuentran principalmente en tejidos animales y que cumplen tanto funciones estructurales (como parte de las membranas celulares) y metabólicas. A pesar de que no están presentes en la grasa de depósito, constituyen una proporción considerable de los lípidos del hígado y del cerebro. También están presentes en el plasma como parte de complejos lípidos-proteínas

denominados *lipoproteínas*; por lo tanto, resultan importantes para la formación de estas macromoléculas, las cuales cumplen un rol importante en el transporte de las grasas. Las lecitinas juegan un papel relevante en la esterificación del colesterol libre para formar colesterol esterificado, son un importante precursor para la formación de los surfactantes pulmonares y forman soluciones coloidales con el agua, aunque se puede preparar una solución acuosa de lecitina por adición de sales biliares. Se cree que un compuesto de ácido biliar lecitina-sal que se forma es hidrosoluble. Las lecitinas no son solubles en acetona; esta propiedad es empleada para separarlas de otros fosfolípidos y lípidos.

Cefalinas. Las cefalinas son estructuralmente parecidas a las lecitinas excepto por el componente correspondiente a la colina. Hay tres fracciones principales: cefalinas de etanolamina, cefalinas de serina y cefalinas de inositol.

Las cefalinas se diferencian de las lecitinas en su insolubilidad en etanol o metanol.

Fosfatidiletanolamina. La fosfatidiletanolamina difiere de las lecitinas en que la etanolamina reemplaza a la colina. Se conocen tanto la alfa, como la beta cefalina. Ésta es una de las cefalinas más abundantes encontradas en plantas y animales superiores.



Fosfatidilserina. La fosfatidilserina, la cual contiene al aminoácido serina en lugar de etanolamina, ha sido encontrada en algunos tejidos como el cerebro.

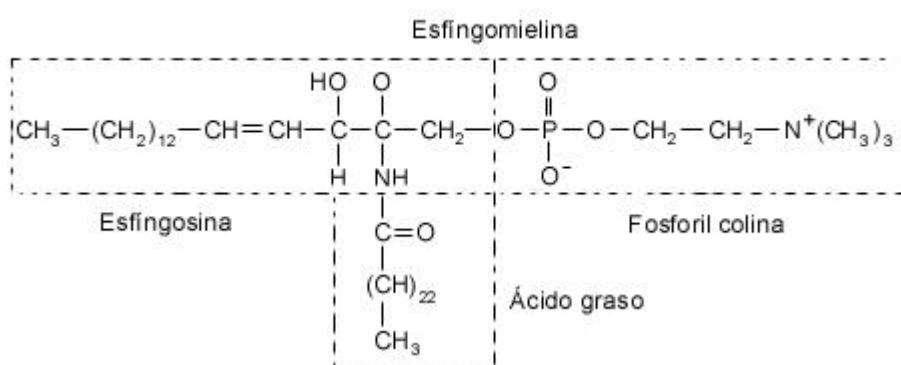
Fosfatidilinositol. El fosfatidilinositol se encuentra entre los fosfolípidos del tejido cerebral, de los porotos de soja y también entre los fosfolípidos de otras plantas. El inositol está presente como estereoisómero del mioinositol.

Plasmalógenos. Los plasmalógenos constituyen tanto como el 10% de los fosfolípidos de las membranas de los nervios y de los músculos. También se los encuentra en el hígado y en otros órganos. Estructuralmente, los plasmalógenos se asemejan a las lecitinas y cefalinas, pero dan reacción positiva cuando se testean los grupos aldehídos con reactivo de Schiff (fucsina-ácido sulfuroso) después de hacer un tratamiento del fosfolípido con cloruro mercúrico. Estos fosfolípidos contienen aldehídos grasos mayores en lugar de ácidos grasos. De esta manera, las unidades básicas de esta clase de compuestos incluyen al glicerol, al

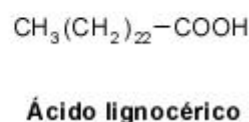
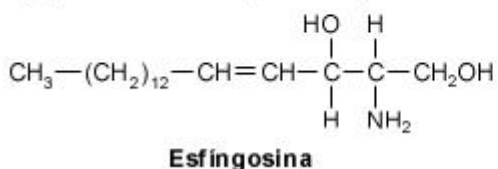
fósforo, al aldehído graso y a la etanolamina.

Esfingolípidos. El grupo dialcoholamino, esfingosina, es característico de todos los esfingolípidos. Sirve como una unidad estructural de sustitución, así como ocurre con el trihidroxialcohol, glicerol, en los glicéridos. La esfingosina es un compuesto de cadena larga C_{18} que contiene un doble enlace *trans*, un grupo NH_2 en C-2 y dos grupos OH (en C-1 y C-3). Los esfingolípidos son especialmente abundantes en el cerebro. Algunas enfermedades de almacenamiento se caracterizan bioquímicamente por la acumulación de ciertos esfingolípidos. Existen cuatro tipos principales (ver Tabla 53-2): esfingomielinas, cerebrósidos, sulfátidos y gangliósidos.

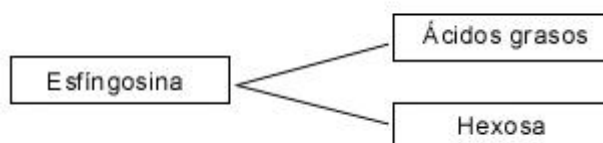
Esfingomielinas. Las esfingomielinas se encuentran en el cerebro y en otros órganos. Los ácidos esteárico, lignocérico y nervónico son los únicos ácidos grasos presentes en las esfingomielinas del cerebro, mientras que los ácidos palmítico y lignocérico son los ácidos grasos de los fosfolípidos del pulmón y del bazo. Una fórmula tipo se muestra siguiente.



by y sus dos constituyentes importantes son:



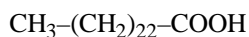
Cerebrósidos. Los cerebrósidos contienen galactosa o glucosa, un ácido graso de alto peso molecular, y esfingosina. De esta manera, los cerebrósidos tienen la siguiente estructura básica:



Estructuralmente, son similares a las esfingomielinas. Los cerebrósidos también pueden ser



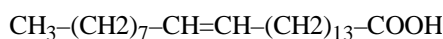
clasificados junto con las esfingomielinas como esfingolípidos. Los cerebrósidos individuales se diferencian por el tipo de ácido graso que contienen en su molécula: las kerasinas contienen ácido lignocérico, los cerebrones contienen un ácido hidroxilignocérico (ácido cerebrónico); los nervones contienen un homólogo del ácido lignocérico denominado ácido nervónico y los oxinervones aparentemente contienen el hidroxil derivado del ácido nervónico como ácido graso constituyente.



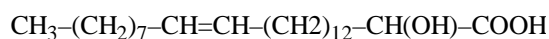
Acido lignocérico



Acido cerebrónico



Acido nervónico



Acido oxinervónico

Los cerebrósidos se encuentran en muchos tejidos además del cerebro. En la enfermedad de Gaucher, el contenido de cerebrósidos de las células reticuloendoteliales (como el bazo) es muy alto. Los cerebrósidos se hallan en concentraciones mucho mayores en fibras nerviosas mielinizadas que no mielinizadas.

Sulfátidos. Los sulfátidos derivan del residuo galactosil de los cerebrósidos.

Gangliósidos. Los gangliósidos son glicolípidos que están presentes en el cerebro (en las células gangliónicas). Los componentes principales son esfingosina, ácidos grasos y carbohidratos de cadena ramificada hasta con siete residuos de azúcar. La construcción de los gangliósidos es similar a la de los cerebrósidos, aunque la parte de carbohidratos es mucho más compleja. Los gangliósidos se diferencian entre sí primariamente por el número de residuos de azúcares.

Derivados lipídicos

Los derivados lipídicos son compuestos derivados de la hidrólisis de grasas simples y conjugadas. Estos incluyen a los compuestos que se describirán más adelante.

Ácidos grasos.

Los ácidos grasos son ácidos carboxílicos de cadena elongada (tanto saturados como insaturados). Se han aislado más de 100 clases diferentes de ácidos grasos a partir de varios lípidos de animales, plantas y microorganismos. Todos ellos poseen una larga cadena hidrocarbonada y un grupo carboxi terminal. Los ácidos grasos pueden obtenerse de la hidrólisis de las grasas o pueden ser sintetizados a partir de unidades de dos carbonos (radicales acetilos). Los ácidos grasos de origen natural generalmente contienen un número



par de átomos de carbono (porque se sintetizan a partir de unidades de dos carbonos) y son derivados de cadenas elongadas. La cadena puede ser saturada (sin dobles enlaces) o insaturadas (con uno o más dobles enlaces).

Se pueden hacer algunas generalizaciones acerca de los ácidos grasos presentes en las plantas y animales superiores. Prácticamente todos tienen número par de átomos de carbono que constituyen cadenas con 14 a 22 átomos de largo; aquellos con 16 y 18 átomos de carbono son los más abundantes. En general, los ácidos grasos insaturados predominan por sobre los saturados, particularmente en las grasas neutras y en las células de organismos poiquilotermos (sangre fría) que viven en zonas de bajas temperaturas. Los ácidos grasos insaturados tienen punto de fusión más bajo que los saturados. La mayoría de las grasas neutras ricas en ácidos grasos insaturados son líquidos hasta 5° C o menores. En la mayoría de los ácidos grasos insaturados de los organismos superiores, hay un doble enlace entre los átomos de carbono 9 y 10; otros dobles enlaces usualmente están presentes entre el C-10 y el metilo terminal de la cadena. En los ácidos grasos con dos o más dobles enlaces, éstos nunca están conjugados, pero se encuentran separados por un grupo metileno. Los dobles enlaces de casi todos los ácidos grasos que se encuentran en la naturaleza tienen configuración *cis*. Los ácidos grasos más abundantes en los organismos superiores son los ácidos oleico, linoleico, linolénico y araquidónico (Tabla 53-5).

Alcoholes.

Los alcoholes de cadena elongada y los alcoholes cíclicos (como los esteroides) son una subclase de derivados lipídicos.

Los esteroides pueden ser clasificados en los grupos siguientes:

- Esteroides
- Ácidos biliares
- Sustancias obtenidas de glucósidos cardiotónicos
- Sustancias obtenidas de las saponinas
- Hormonas sexuales
- Adrenocorticosteroides
- Vitamina D

Estos compuestos están ampliamente distribuidos en las plantas y tejidos animales, tanto al estado libre como bajo la forma de ésteres (en combinación con ácidos grasos mayores). Químicamente se sabe que son derivados fenantrénicos, o más correctamente, derivados del ciclopentanoperhidrofenantreno.

Esteroides. El esteroide más conocido es el colesterol. Está presente en todas las células animales y es particularmente abundante en el tejido nervioso y en el hígado. Cantidades variables de este esteroide se encuentran en las grasas animales pero no en las grasas vegetales. La estructura de la molécula de colesterol está ilustrada en la Fig. 53-7.

El colesterol es el precursor de muchos esteroides en tejidos animales, incluyendo los ácidos biliares, los compuestos tipo detergentes que ayudan en la emulsificación y absorción de los lípidos en el intestino; los andrógenos u hormonas sexuales masculinas; los estrógenos u hormonas sexuales femeninas; las hormonas progestacionales; y las hormonas adrenocorticales.

El colesterol es un miembro de un amplio grupo de esteroides llamados *esteroides*. Es un alcohol esteroideo que contiene un grupo hidroxilo en el carbono 3 del anillo A y una



cadena ramificada alifática de ocho o más átomos de carbono en el carbono 17. Los esteroides se presentan tanto como alcoholes libres o como ésteres de ácidos grasos de cadena larga en el grupo hidroxilo del carbono 3; todos son sólidos a temperatura ambiente. El colesterol se funde a 150° C y es insoluble en agua, aunque se extrae de los tejidos con cloroformo, éter o alcohol caliente. El colesterol se encuentra en las membranas plasmáticas de las células animales y en las lipoproteínas de la sangre. Sólo se encuentra en los tejidos y fluidos de origen animal, nunca en las plantas.

Otros esteroides similares son los fitosteroides, que son esteroides de las plantas. Entre ellos están el estigmasterol, el campesterol y el sitosterol.

Los hongos y levaduras contienen aún otros tipos de esteroides, los micosteroides. Entre ellos se encuentra el ergosterol, el cual es convertido en vitamina D.

Ácidos biliares. Los ácidos biliares (un esteroide de C₂₄) son constituyentes de la bilis que promueven la digestión. Son agentes tensioactivos. Esto significa que disminuyen la tensión superficial y por lo tanto pueden emulsificar grasas, un paso importante en la formación de las micelas. Los ácidos biliares también activan las lipasas gastrointestinales. Por estos motivos, los ácidos biliares cumplen un rol fisiológico importante en la digestión y absorción de las grasas.

Los mayores ácidos biliares primarios son el ácido cólico y el ácido quenodesoxicólico, los cuales se originan en el hígado por clivaje enzimático de los tres carbonos terminales de la molécula de colesterol (un hidrocarburo de C₂₇). De esta manera, los ácidos biliares son uno de los productos finales del metabolismo del colesterol; sin embargo, debería destacarse que los ácidos biliares constituyen la fracción esteroide ácida de la bilis, lo cual es entre 50% y 60% del total de los esteroides excretados. El resto de los esteroides eliminados en la bilis están bajo la forma de esteroides neutros, como el colesterol.

Hidrocarburos. Los hidrocarburos son a la vez alifáticos y compuestos cíclicos.

Vitaminas. Las vitaminas y sus estructuras son presentadas en el capítulo 39. Las hormonas son presentadas en el capítulo 43.

Otros compuestos lipídicos.

Los sulfolípidos, los aminolípidos y las lipoproteínas también pueden ser ubicados dentro de esta categoría.

Propiedades Físicas y Químicas

Punto de fusión

El punto de fusión de los ácidos grasos es influenciado por el largo de la cadena y el grado de insaturación de la misma. Al aumentar el largo de la cadena y disminuir el número de dobles enlaces insaturados, aumentará el punto de fusión de los ácidos grasos. El punto de fusión de los ácidos grasos y de otros lípidos puede usarse para identificar el compuesto, aunque esta propiedad no es utilizada de rutina en los análisis.

Solubilidad

La relativa insolubilidad de los lípidos en soluciones acuosas es una importante



propiedad de los lípidos. La mayor consecuencia de esta insolubilidad es que frecuentemente el análisis de los lípidos requiere un tratamiento previo de la muestra para extraer el lípido en un medio más soluble como metanol, cloroformo o éter.

La insolubilidad del colesterol no esterificado se usó en el pasado para ciertos ensayos de colesterol. El colesterol puede ser cuantitativamente separado de los ésteres de colesterol por precipitación con digitonina como un complejo molecular 1:1 de digitónido de colesterol. La medida gravimétrica de la cantidad del complejo digitónido formado ha sido la base de la cuantificación del colesterol en el pasado.

Gravedad específica

La densidad de todas las grasas es menor a 1 g/mL; en consecuencia todas las grasas flotan en agua. Esta característica ha permitido que las lipoproteínas fueran selectivamente separadas de las proteínas más densas y de las otras lipoproteínas en base a las diferentes proporciones del contenido lipídico.

Grupos alcohol de los esteroides

El grupo alcohol químicamente reactivo de los esteroides es la base de muchos ensayos de cuantificación del colesterol. El grupo puede reaccionar con ácidos minerales fuertes como el ácido sulfúrico, y con sales para así formar el cromógeno. La reacción de Burchard-Liebermann es la más frecuentemente utilizada.

El grupo hidroxilo puede ser oxidado específicamente por la enzima colesterol oxidasa. El monitoreo de esta reacción es la base de los ensayos enzimáticos para colesterol.

Composición de los triglicéridos

La composición química de los triglicéridos (es decir, la esterificación del glicerol por tres ácidos grasos) es la base de todos los métodos de cuantificación de los triglicéridos. Estas técnicas se basan en la cuantificación del glicerol liberado de los triglicéridos después de la hidrólisis química o enzimática de los ésteres de ácidos grasos. El glicerol puede ser oxidado química o enzimáticamente para que forme cromógenos medibles.

Composición química

Los fosfolípidos son detectados por reacciones específicas para el fósforo después de la reacción química.

Propiedades Biológicas

Las propiedades biológicas más importantes de los lípidos son estructurales, nutricionales y hormonales. Casi todas las clases de lípidos son usados como componentes estructurales de las membranas. Los triglicéridos son componentes esenciales en la formación de las membranas bimoleculares proteína- lípido- lípido- proteína. Las membranas celulares también contienen cantidades variables de esteroides, fosfolípidos y otros lípidos complejos.

Los triglicéridos también funcionan como una importante fuente de calorías y de



átomos de carbono para la síntesis de otras macromoléculas.

El rol de los esteroides como hormonas tiene una gran influencia en el trabajo del laboratorio debido a la necesidad de su determinación. Estas hormonas fueron medidas inicialmente por alguno de los métodos discutidos previamente. Sin embargo, éstos han sido reemplazados por métodos inmunoquímicos.

Parte III: Carbohidratos

Lawrence A. Kaplan

Definición y Clasificación

Se asignó a los primeros carbohidratos la fórmula empírica $(CH_2O)_n$. De esta forma estos químicos fueron definidos simplemente como compuestos consistentes en carbonos hidratados (H_2O), de ahí el nombre de carbohidrato. Más tarde se notó la existencia de carbohidratos complejos conteniendo otras estructuras químicas. Por ejemplo, pueden estar unidos a proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. En adelante discutiremos la variadas clases de carbohidratos.

Carbohidratos monoméricos simples (sacáridos)

Los sacáridos son conocidos también como *azúcares*, y sus nombres comunes terminan en todos los casos con el sufijo *-osa*, que significa "azúcar". La unidad azúcar más pequeña se denomina monosacárido, en los cuales n en la fórmula de arriba y va desde 3 a 8. Si $n = 3$, el azúcar es una triosa; si $n = 4$, una tetrosa; etc. Los monosacáridos son cadenas lineales en las que cada átomo de carbono, excepto uno, contiene un grupo hidroxilo ($-OH$); el átomo de carbono remanente contiene un grupo carbonilo. Si el grupo carbonilo está en el primer o en el último átomo de carbono es un aldehído y el monosacárido se denomina *aldosa*. Si el grupo carbonilo está en un átomo de carbono interno, es una *cetona*, y el monosacárido se denomina *cetosa* (Fig. 53-8). Por lo tanto una aldosa de 4-carbonos es una aldotetrosa, una cetosa de 6-carbonos es una cetohehexosa, etc.

Los monosacáridos que encontramos en la naturaleza son todos estereoisómeros. El estereoisomerismo está físicamente definido como la habilidad de una molécula de rotar el plano de la luz polarizada. Las propiedades físicas y químicas de, por ejemplo, las ocho aldohexosas (6-átomos en la cadena carbonada) son exactamente las mismas excepto por sus diferentes acciones sobre la luz polarizada. Todos los monosacáridos en bioquímica humana son de la forma dextroisomérica (D). Algunos ejemplos de monosacáridos están dados en la Fig. 53-9.

Los monosacáridos y pentosas hexosas también tienen la capacidad de formar estructuras anulares por reacciones intramoleculares entre el grupo hidroxilo terminal con la función carbonilo. Las formas anulares de seis miembros se denominan *piranosas*, mientras que los anillos de cinco miembros se llaman *furanosas*. Las aldohexosas, tal como la D-glucosa, forma anillos de seis miembros, en tanto una aldocetosa, como por ejemplo la D-fructosa, forma un anillo de cinco miembros.(Fig. 53-9).



La glucosa puede formar dos tipos de anillos de seis unidades. Los anillos difieren en la forma en que el grupo hidroxilo en el átomo de carbono uno se posiciona respecto al plano del anillo. Si el grupo hidroxilo está del mismo lado de la molécula que el anillo del oxígeno (Fig. 53-9), el isómero es conocido como α -D-glucosa, mientras que si el grupo hidroxilo está en el lado opuesto al anillo del oxígeno el isómero es conocido como la forma β -D-glucosa. Las enzimas que actúan sobre los carbohidratos en general tienen especificidad dirigida hacia una de las formas estereoisoméricas, en principio hacia la más comúnmente encontrada, por ejemplo β -D-fructosa.

Monosacáridos derivados

Los monosacáridos derivados se forman por la reducción u oxidación del grupo carbonilo. Los productos de reacciones reductoras son poliholes (polialcoholes) tales como el D-sorbitol o el D-mannitol, mientras que los productos de oxidación son ácidos, como por ejemplo el ácido D-glucorónico (de la D-glucosa). Muchas formas ácidas de monosacáridos son importantes constituyentes de carbohidratos más complejos, tales como los mucopolisacáridos.

Un grupo importante de monosacáridos derivados resultan del reemplazo de un grupo hidroxílico por un grupo amino. El término *ácido siálico* se usa para describir los *N*-acetil derivados del ácido neuramínico, los cuales están con frecuencia unidos covalentemente a proteínas (Fig. 53-10).

Carbohidratos complejos

Estas moléculas están formadas por unión de dos o más monosacáridos por medio de una unión glicosídica (Fig. 53-11). Los disacáridos más simples, importantes desde un punto de vista nutricional, son la maltosa (dos glucosas), lactosa o azúcar de la leche (una galactosa y una glucosa) y la sucrosa (una fructosa y una glucosa). Los oligosacáridos se definen con frecuencia como carbohidratos que contienen de 2 a 10 unidades de monosacáridos. Los polisacáridos son polímeros mayores de hasta 100 millones de daltones. Los tres polisacáridos más importantes contienen glucosa como subunidad monomérica. La celulosa, un componente estructural de las paredes de las plantas, consiste en unidades de glucosa unidas por puentes glicosídicos a β -(1 \rightarrow 4) para formar cadenas largas y no ramificadas. El almidón, una forma de almacenar glucosa en las plantas, consiste en residuos de glucosa conectados por uniones glicosídicas α -(1 \rightarrow 4), las cuales, a diferencia de las uniones β -(1 \rightarrow 4) de la celulosa, son factibles de degradarse por enzimas hidrolíticas humanas (tal como la amilasa). El almidón también se diferencia de la celulosa en tanto que es una molécula ramificada. Los puntos de ramificación distribuidos en la molécula son formados por puentes α -(1 \rightarrow 6). El almidón está constituido por dos compuestos: la *amilosa* (el fracción de cadena lineal) y la *amilopectina* (fracción altamente ramificada). El glucógeno es la forma de almacenaje de glucosa encontrado en las células animales. El glucógeno se asemeja más a la amilopectina que a la amilosa debido a su estructura altamente ramificada (ver Fig. 32-4).

Los polisacáridos complejos conteniendo ácido hialurónico, condroitin-4 sulfato y keratin sulfato como unidades repetitivas son constituyentes importantes del líquido sinovial y



del tejido conectivo. La heparina es un polisacárido complejo que contiene ácido 2-sulfato D-glucorónico-*N*-acetil-D-glucosamina-6-sulfato como unidades repetitivas.

Propiedades Químicas

Los monosacáridos (pentosas o de mayor tamaño aún) pueden sufrir deshidrataciones en presencia de ácidos minerales en caliente para formar los derivados furfurados cíclicos. Podemos deshidratar glucosa de esta forma y obtener 3-hidroximetilfurfural, en una reacción que es la base del ensayo colorimétrico para medir proteínas glicosiladas.

Una importante propiedad química de los monosacáridos es su susceptibilidad a la oxidación o reducción a cambio de reducir u oxidar otros compuestos. La habilidad de las aldosas reductoras, como por ejemplo la glucosa, de ser oxidadas a la forma ácida ha sido, históricamente la base para los ensayos químicos de glucosa. A su vez, la glucosa reduce compuestos tales como el Cu^{++} o $\text{Fe}(\text{CN})_6^-$ formando complejos coloreados con las formas reducidas de estas sustancias (por ejemplo Cu^+ y Cu_2O).

La oxidación enzimática de la glucosa por la glucosa oxidasa es la base de muchos de los procedimientos corrientes para el dosaje de glucosa, mientras que la oxidación de la glucosa-6-fosfato es la base del ensayo de hexokinasa para glucosa.

Las aldosas, por ejemplo la glucosa, pueden reaccionar con aminas primarias para formar las bases de Schiff. Esta condensación no enzimática es el mecanismo para la formación de glicoproteínas en sangre. Además, la reacción de la glucosa con aminas primarias aromáticas, tal como la *o*-toluidina, es la base de un método histórico importante para la medida de glucosa sanguínea.

Propiedades Físicas

Los monosacáridos y disacáridos comúnmente medidos son compuestos altamente solubles en agua. Los ensayos para estos analitos por lo tanto no requieren extracciones o purificaciones previas. La separación de monosacáridos por cromatografía de absorción es posible, aunque esta técnica es en general realizada por laboratorios especializados en metabolismo. Los monosacáridos simples, disacáridos, o polisacáridos en realidad no son distinguibles por sus propiedades espectrales o electroforéticas.

Propiedades Biológicas

Los monosacáridos y disacáridos son la mayor fuente de calorías en el cuerpo humano y como tal se utilizan como forma primaria de nutrición. Las formas poliméricas de glucosa, tales como el glucógeno sirven como forma de almacenaje de glucosa en hígado y células musculares. Los polisacáridos complejos se encuentran en los fluidos corporales y en tejido conectivo.



Bibliografía

General

Friedman PJ: *Biochemistry*, New York, 1995, Little, Brown & Co.

Glick DM: *Biochemistry*, Stamford, Conn., 1995, Appleton & Lange.

Werner R: *Essential biochemistry and molecular biology*, Stamford, CT, 1992, Appleton & Lange.

Proteínas y aminoácidos

Creighton TE: *Proteins: structure*, New York, 1995, WH Freeman.

Kyle J: *Structure in protein chemistry*, New York, 1995, Garland Press.

Lípidos

Sebedio JL, Perkins EG, editors: *New trends in lipid and lipoprotein analysis*, Champaign, Ill., 1995, AOCS Press.

Cave G, Paltauf F, editors: *Phospholipids: characterization, metabolism, and novel biological applications*, Champaign, Ill., 1995, AOCS Press.

Carbohidratos

Brinkley RW: *Modern carbohydrates chemistry*, New York, 1988, Marcel Dekker.

Chaplin MF, Kennedy JF, editors: *Carbohydrate analysis*, ed 2, New York, 1994, Oxford University Press.

Tablas

Tabla 53-1. Clasificación y propiedades para las cadenas laterales (grupos R) de aminoácidos que se encuentran naturalmente.

NH ₂ R grupo (R-CHCOOH)	L-Aminoácido (símbolo)	Aminoácido peso molecular	pK _a * (25° C)		
			Primario -COOH	Primario -NH ₂	Grupos Secundarios
Nopolar (hidrofóbico)					
H-	Glicina (gly), G	75.07	2.34	9.60	-
CH ₃ -	Alanina (ala), A	89.09	2.34	9.69	-
CH ₃ \ CH- / CH ₃ H ₃ C \ H ₃ C	Valina (val), V	117.15	2.32	9.62	-



$\text{CH}-\text{CH}_2-$ / H_3C	Leucina (leu), L	131.18	2.36	9.60	—	
$\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}-$ CH_3	Isoleucina, (ile), I	131.18	2.36	9.68	—	
$-\text{CH}_2-$	Fenilalanina (phe), F	165.19	1.83	9.13	—	
HC_2-CH_2- HC_2-CH_2 \ N H	Prolina (pro), P	115.13	1.99	10.60	—	
$\text{CH}_3-\text{S}-\text{CH}_2\text{CH}_2$	Metionina (met), M	149.21	2.28	9.21	—	
Neutro polar (hidrofilico)						
OHCH_2-	Serina (ser), S	105.09		2.21	9.15	—
$\text{CH}_3-\text{CH}-$ OH O 	Treonina (thr), T	119.12	—	—	—	
NH_2-CCH_2 O 	Asparagina (asp), D	132.12	2.02	8.80	—	
$\text{NH}_2-\text{CCH}_2\text{CH}_2-$	Glutamina (gln), Q	146.15	2.17	9.13	—	
HSCH_2-	Cisteína (cys), C	121.16	1.96	10.28 (30°)	8.18 (SH)	
HO $-\text{CH}_2-$	Tirosina (tyr), Y	181.19	2.20	9.11	10.07 (OH)	
$\text{C}-\text{CH}_2-$	Triptofano (trp), W	204.23	2.38	9.39	—	
Acídico polar (hidrofilico)						
HOOCCH_2-	Acido aspártico (asp)	133.10	1.88	9.60	3.65 (COOH)	
$\text{HOOCCH}_2-\text{H}_2-$	Acido Glutámico (glu)	147.13	2.19	9.67	4.25 (COOH)	
Básico polar (hidrofilico)						
$\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}-$ CH_2C NH	Lisina (lys)	146.19	2.18	8.95	10.53 (E-NH ₃)	



$\begin{array}{c} \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{N}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{Arginina} \\ \text{H} \end{array}$	174.20	2.17	9.04	12.48	(guanidino)
$\begin{array}{c} \text{HC}=\text{CH}_2- \\ \quad \\ \text{N} \quad \text{NH} \end{array}$	Histidina (his)	155.16	1.82	9.17	6.00 (imidazolio)
$\begin{array}{c} \parallel / \\ \text{C} \\ \text{H} \end{array}$					
De Cohn EJ, Edsall JT: <i>Proteins, amino acids and peptides</i> , New York, 1943, Reinhold Co.					
*El valor de pK _a sea significativamente diferente en una molécula de proteína.					

Tabla 53-2. Tipos de interacciones intramoleculares de cadenas laterales de grupos-R de proteínas

Tipo de unión	Esquemática*
Covalente Disulfuro (cistina)	
Lisinonorleucina(en colágeno)	
Nocovalente Electrostática	
Hidrógeno	
Hidrofóbica	
Van der Waals	



*Wavy line, Cadena polipeptídica.

Tabla 53-3. Funciones Biológicas de las proteínas.

Función	Ejemplo
Transporte de moléculas pequeñas	Transcortina (cortisol), tiroxina (GFT)
Receptores	Receptores de estríol (citoplasmático), receptor de insulina (superficie)
Catalíticas	Todas las enzimas
Estructurales	Colágeno
Nutricionales (fuente de calorías y aminoácidos)	Albúmina
Presión oncótica	Albúmina
Defensa del huésped frente a antígenos externos	Anticuerpos (todas las clases)
Hormonas	Hormona estimulante de tiroides (TSH)
Coagulación	Fibrinógeno

Tabla 53-4. Clasificación de fosfátidos y glicolípidos.

Nombre	Principales alcoholes	Otros componentes alcohólicos
Glicerofosfátidos		
Ácido fosfatídicos	Diglicéridos (= diésteres de glicerol)	
Lecitina	Diglicérido (= diésteres de glicerol)	Colina
Cefalina	Diglicéridos (= diésteres de glicerol)	Etanolamina, serina
Inositido	Diglicérido (= diésteres de glicerol)	Inositol
Plasmalógenos (acetal fosfátidos)	Éster de Glicerol y éter etílico	Etanolamina, colina
Esfingolípidos		
Esfingomielinas	N-Acilesfingosina	Colina
Cerebrósidos	N-Acilesfingosina	Galactosa,*



Sulfátidos	<i>N</i> -Acilesfingosina	glucosa*
Gangliósidos	<i>N</i> -Acilesfingosina	Galactosa*
		Hexosas,*
		hexosamina,*
		ácido neuramínico*
* Estos componentes no están presentes como esteres fosfóricos pero sí en uniones glicosídicas; por esta razón, los cerebrósidos, sulfátidos, y gangliósidos se denominan glicolípidos.		

Tabla 53-5. Ácidos grasos no saturados más comunes, números de doble uniones, y largo de la cadena carbonada.

Acido graso	Número de doble uniones	Número de carbonos
Palmitoleico	1	16
Oleico	1	18
Linoleico	2	1
Linolenico	3	18
Araquidónico	4	20

Figuras

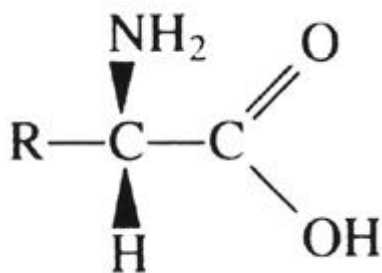
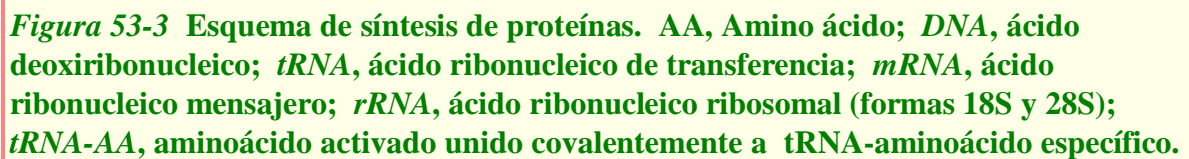
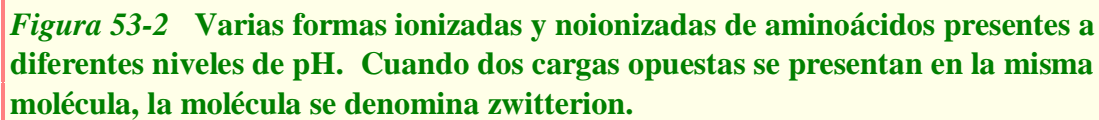


Figura. 53-1 Estructura general de aminoácidos de la forma estereoisomérica-L. *Líneas gruesas*, uniones que salen del plano de la pág.; *líneas punteadas*, uniones que se extienden hacia atrás del plano del papel.



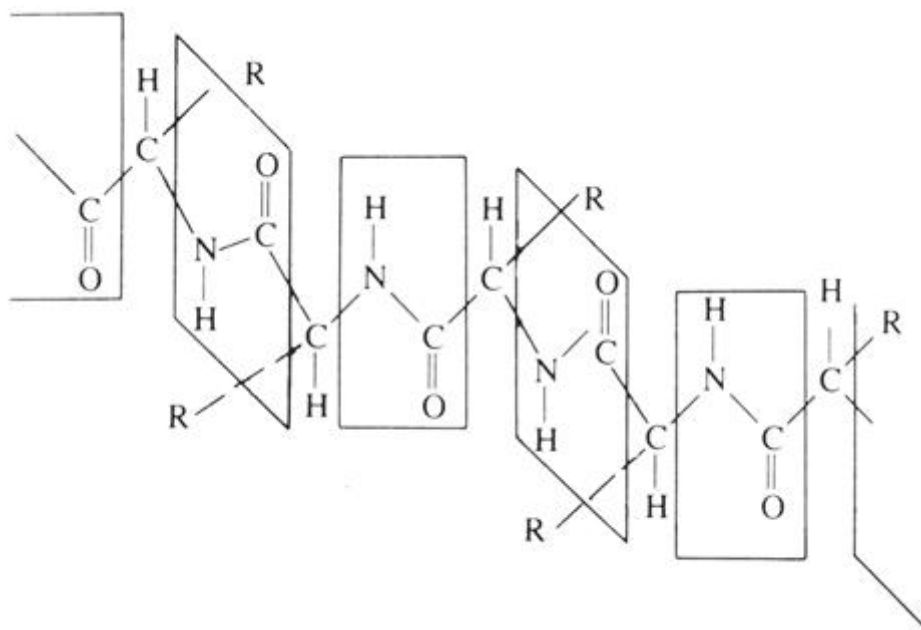


Figura 53-4 Arreglo espacial de la unión peptídica. *C*, átomo de carbono; *N*, átomo de nitrógeno; *H*, átomo de hidrógeno; *O*, átomo de oxígeno. (De Orten JM, Neuhaus OW: *Human biochemistry*, ed 10, St. Louis, 1982, Mosby.)



Figura 53-5 Esquema de las tres distribuciones espaciales posibles de las cadenas polipeptídicas que definen la estructura secundaria de las proteínas.

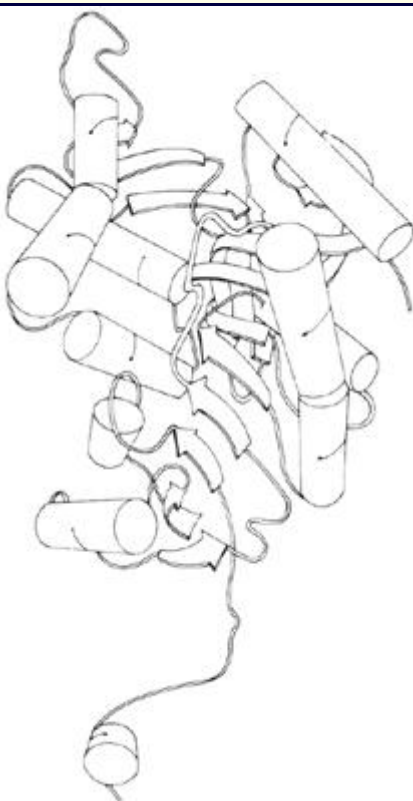


Figura 53-6 Esquema de la estructura terciaria de una proteína. *Cilindros*, α -hélice; *flechas planas*, hojas β -plegada; *líneas*, ovillo al azar de la estructura secundaria de lactato deshidrogenasa. (De Orten JM, Neuhaus OW: Human biochemistry, ed 10, St. Louis, 1982, Mosby.)

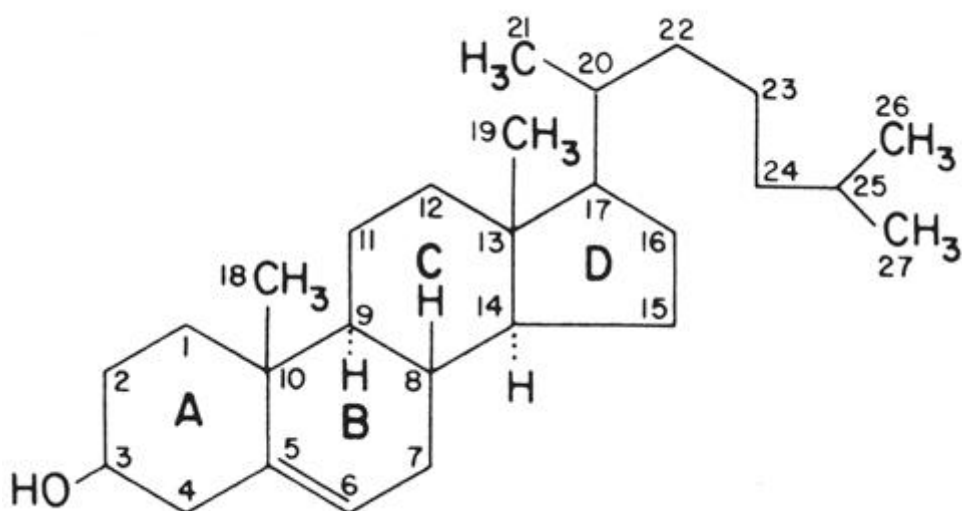


Figura 53-7 Estructura de la molécula de colesterol, un esteroide hidrocarbonado C_{27} .

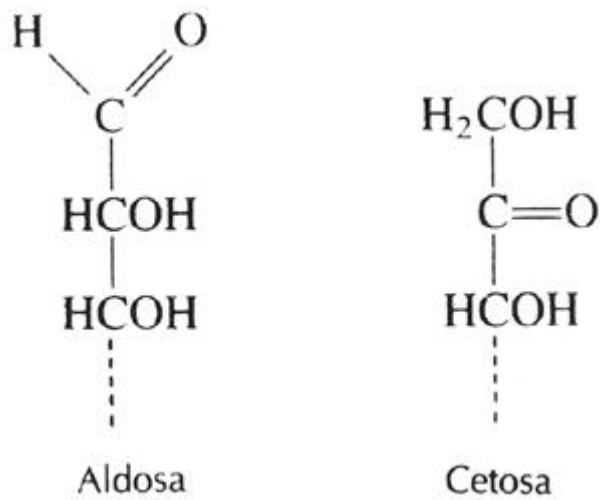


Figura 53-8 Diferencias estructurales entre aldosas y cetosas, las cuales son respectivamente, aldehídos y cetonas.

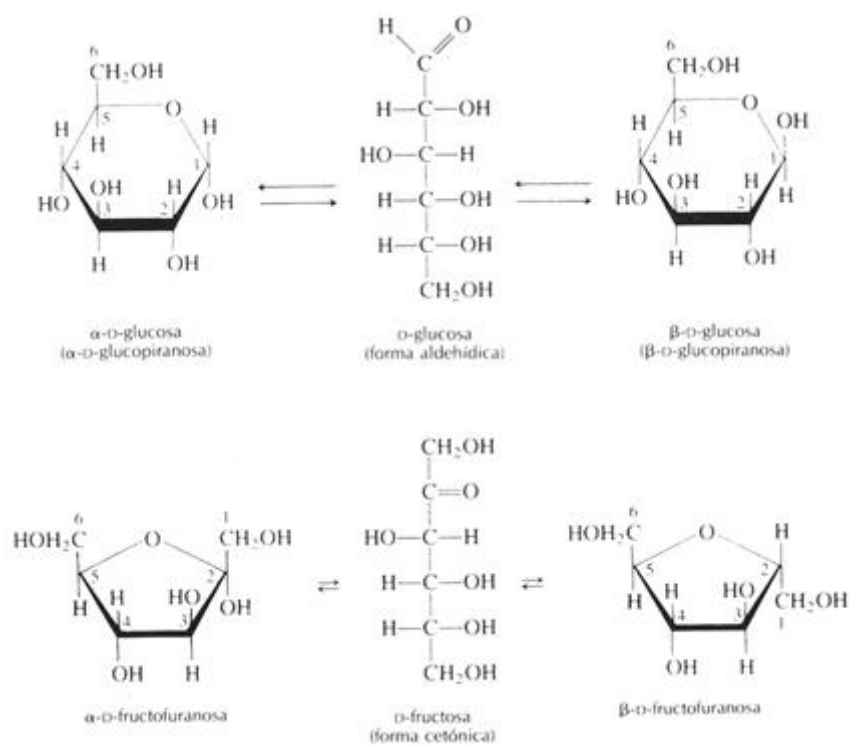
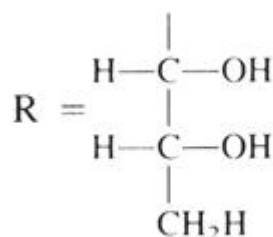
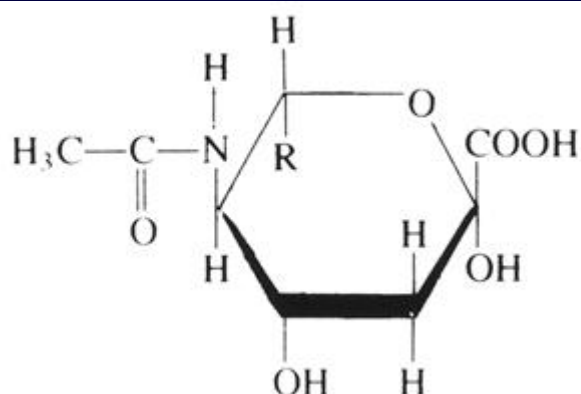


Figura 53-9 Interrelaciones entre cadenas lineales y formas anulares de D-glucosa y D-fructosa, las cuales forman anillos de piranosa y furanosa. (De Orten JM, Neuhaus OW: *Human biochemistry*, ed 10, St. Louis, 1982, Mosby.)



Ácido *N*-acetilneuramínico

Figura 53-10 Estructura del ácido *N*-acetilneuramínico ("ácido siálico"). (De Orten JM, Neuhaus OW: *Human biochemistry*, ed 10, St. Louis, 1982, Mosby.)

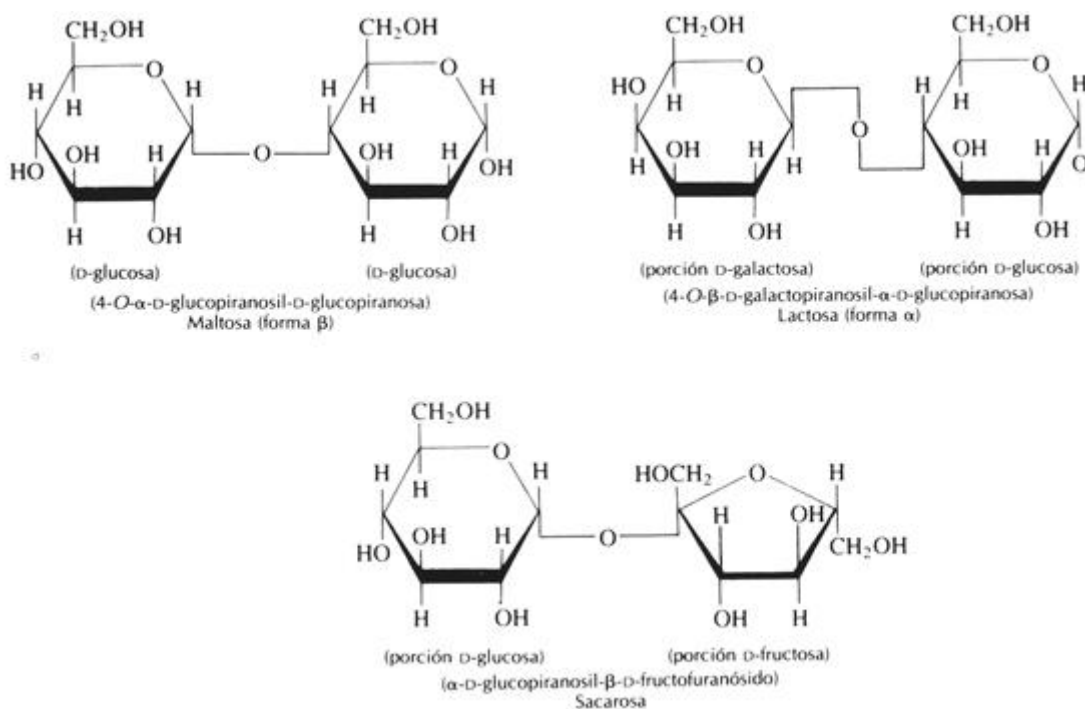




Figura 53-11 Disacáridos más comunes unidos por uniones β -glicosídicas. (De Orten JM, Neuhaus OW: *Human biochemistry*, ed 10, St. Louis, 1982, Mosby.)

CAPÍTULO 54

54. Enzimología Clínica

David C. Hohnadel

La naturaleza de las enzimas

- Composición y estructura
- Cofactores y apoenzimas
- Catalizadores
- Sitios reactivos
- Especificidad de reacción
- Estructura de subunidades
- Catabolismo y anabolismo

Clasificación de las enzimas

- Códigos y nombres de la Unión Internacional de Bioquímica (IUB)
- Clasificación según la Comisión de Enzimas (EC)
- Abreviaturas no estándares

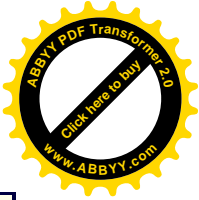
Medición de enzimas

- Ensayos enzimáticos
- Principios de ensayos cinéticos
- $V_{\text{máx}}$ y K_m
- Cálculo de la actividad enzimática
- Factores analíticos que afectan la medida enzimática
- pH
- Amortiguadores
- Cofactores
- Inhibidores y activadores
- Enzimas acoplantes
- Temperatura
- Definición de las condiciones de ensayo
- Enzimas como reactivos
- Almacenamiento de enzimas

Medición de enzimas en la clínica

- Enzimas celulares versus enzimas extracelulares
- Las enzimas como marcadores tumorales

Factores que afectan los valores de referencia



Tiempo de muestreo

Edad

Sexo

Raza

Ejercicio

Isoenzimas

Nomenclatura

Isoformas

Significado clínico

OBJETIVOS

- Conocer la clasificación de las enzimas según la Unión Internacional de Bioquímica (ampliamente conocida bajo su abreviatura inglesa IUB, por “International Union of Biochemistry”) y el por qué del uso de otros nombres.
- Describir las diferencias entre apoenzimas, cofactores, holoenzimas.
- Enumerar los principales parámetros cinéticos usados para describir la actividad enzimática.
- Aprender a derivar la ecuación de Michaelis-Menten.
- Entender cómo el pH, amortiguadores, cofactores, y temperatura afectan los ensayos cinéticos.
- Describir como las variables preanalíticas influyen sobre los intervalos de referencia.

Términos clave

activadores Son los iones inorgánicos llamados cofactores, que son requeridos para una reacción enzimática.

actividad Es la cantidad de sustrato que se transforma en producto por unidad de tiempo y bajo condiciones definidas, para una reacción enzimática en particular.

actividad específica Es la actividad enzimática expresada como unidades por miligramo de proteína.

aminoácidos hidrofóbicos Son aminoácidos no polares, insolubles en agua.

aminoácidos hidrofílicos Son aminoácidos polares, solubles en agua.

apoenzima Es una enzima sin ningún cofactor ni grupo prostético asociado.

catalizador Sustancia que aumenta la velocidad de una reacción sin experimentar cambios en su estructura química.

cinética enzimática Es el estudio de la velocidad de una reacción enzimática y los factores que la afectan.

cinética de primer orden Es un estado que se da cuando la velocidad de una reacción enzimática es proporcional a la concentración de sustrato.

cinética de orden cero Estado que ocurre cuando la velocidad de una reacción enzimática es independiente de la concentración de sustrato.

coenzimas Son cofactores orgánicos tales como el fosfato de piridoxal y el pirofosfato de tiamina.

cofactores Son sustancias no proteicas asociadas con una enzima, necesarias para la actividad catalítica.

complejo enzima-sustrato Es un complejo intermediario, activo, formado entre el sustrato y



la enzima durante la reacción.

condiciones óptimas de ensayo Son las condiciones para la reacción en cuanto a la concentración de sustrato, cofactores, activadores y soluciones amortiguadoras que producen la máxima velocidad de catálisis enzimática.

constante de equilibrio Es el cociente entre la concentración de producto y la concentración de sustrato cuando la reacción está en equilibrio.

código EC Es el código de cuatro números de la Comisión de Enzimas para la clasificación sistemática de las reacciones enzimáticas.

constante de Michaelis-Menten Es una constante que relaciona las constantes de velocidad de una reacción enzimática y que es igual a la concentración de sustrato que produce la mitad de la velocidad catalítica máxima.

desnaturalización Es la pérdida de las propiedades biológicas de una proteína, usualmente como resultado de cambios en la estructura terciaria o cuaternaria.

energía de activación Es la energía requerida en una reacción química para transformar los reactantes a especies en estado de transición o activadas que espontáneamente se transformarán en productos.

ELISA Ensayo en el que una enzima está unida a un inmunoabsorbente.

ensayos acoplados Son ensayos con varias reacciones enzimáticas que conducen a una reacción indicadora que posee una sustancia fácilmente cuantificable.

ensayos cinéticos Son ensayos en los cuales se forman cantidades crecientes de producto con el tiempo, y que se monitorean a través de múltiples lecturas.

enzima auxiliar Es una enzima que relaciona la enzima que está siendo medida con una enzima indicadora, en un sistema de reacciones acopladas.

enzimas Son materiales biológicos (proteínas) con propiedades catalíticas.

enzimas constitutivas Son enzimas que están siempre presentes durante la vida de una célula.

enzimas indicadoras Enzimas que producen (o consumen) una sustancia fácilmente cuantificable.

enzimas inducibles Enzimas cuya concentración celular aumenta en presencia de estímulos apropiados.

enzimas lábiles Proteínas inestables o que se desnaturalizan fácilmente.

endopeptidasas Son enzimas que hidrolizan proteínas mediante la ruptura de enlaces en el interior de un sustrato proteico.

especificidad de unión Es la capacidad de la acción enzimática de producir la ruptura de sólo ciertas uniones entre átomos.

especificidad enzimática Es el grado con que una enzima catalizará una o más reacciones enzimáticas.

especificidad estereoisomérica Es la especificidad de una enzima por una de las formas de un par DL de compuestos que poseen un átomo de carbono asimétrico.

estructura cuaternaria Es la relación estructural entre varias subunidades de una enzima.

estructura primaria Es la secuencia de aminoácidos de una proteína.

estructura secundaria de una enzima Es la secuencia de aminoácidos dentro de una relación estérica semifija en dos dimensiones.

estructura terciaria de una enzima Es el plegamiento de las cadenas de aminoácidos en una estructura tridimensional



- exopeptidasas** Son enzimas que hidrolizan proteínas mediante la ruptura de uniones procediendo desde un extremo del sustrato proteico hacia el centro del mismo.
- fase de consumo de sustrato** Es el período de tiempo en un ensayo enzimático en el cual la concentración de sustrato cae y el ensayo no sigue una cinética de orden cero.
- fase lineal** Etapa en la que un ensayo sigue una cinética de orden cero generando una cantidad constante de producto por unidad de tiempo.
- grupos prostéticos** Son cofactores que están tan estrechamente unidos que son considerados parte de la estructura de la enzima.
- holoenzimas** Es el complejo completo enzima-cofactor que confiere máxima actividad catalítica.
- inactivación** Es la desnaturalización reversible de la proteína.
- inhibidor competitivo** Es un inhibidor de una reacción enzimática que compite con el sustrato por la unión en el sitio activo.
- inhibidor acompetitivo** Es un inhibidor que se une sólo al complejo enzima-sustrato y no a la enzima libre.
- inhibidores** Materiales que reducen la actividad catalítica de una enzima.
- inhibidor no competitivo** Es un inhibidor que se une a un sitio alostérico de una enzima y no compite con el sustrato por su unión al sitio activo.
- isoenzimas** Diferentes formas de una enzima que catalizan la misma reacción.
- katal (kat, k)** Es una unidad enzimática en moles por segundo definidas por el sistema SI:
 $1 \text{ K} = 6.0 \times 10^7 \text{ U}$.
- K_m** Es el símbolo para referirse a la constante de Michaelis-Menten.
- metaloenzimas** Enzimas que se encuentran unidas estrechamente a iones metálicos.
- período lag** Es el intervalo de tiempo inicial en un ensayo, cuando ocurre la mezcla de reacción y comienza a establecerse el equilibrio cinético y de temperatura en un ensayo enzimático.
- reacciones de punto final** Son reacciones en la cual se realiza una única medición a un tiempo fijo.
- reactivación** Es la recuperación de las propiedades biológicas de una proteína luego de una pérdida temporal.
- Sistema Internacional de Unidades** Es un sistema internacional de unidades para todo tipo de cantidades científicas; unidades SI.
- sistemas in vitro** Son aquellos sistemas que se llevan a cabo en un tubo de ensayo, fuera de un organismo vivo.
- sitio catalítico** Es otro nombre para designar el sitio activo.
- sitios activos** Son las áreas específicas ubicadas en una enzima, donde el sustrato se une y donde ocurre la catálisis.
- sitios alostéricos o sitios regulatorios** Son los sitios distintos al o a los sitios activos de una enzima que unen moléculas regulatorias y afectan la actividad de la enzima.
- sitios de unión** Son sitios sobre la superficie de la enzima que sirven para unir el sustrato o el producto de la reacción.
- sitios regulatorios** Ver *sitios alostéricos*
- subunidades** Cadenas proteicas simples provenientes de enzimas formadas por dos o más cadenas peptídicas en su forma activa.



sustratos Materiales sobre los cuales actúan las enzimas.

TIAE Es una técnica de inmunoanálisis amplificado por una enzima.

unidad internacional de actividad enzimática Es la cantidad de enzima que cataliza la conversión de una micromol de sustrato por minuto bajo condiciones definidas; $1 \text{ U} = 1,67 \times 10^{-8} \text{ katal}$.

velocidades iniciales Mediciones enzimáticas realizadas al comienzo de una reacción inmediatamente después del período lag.

$V_{m\acute{a}x}$ Es la velocidad máxima de catálisis obtenida a partir de la variación de sustrato.

La Naturaleza de las Enzimas

Las enzimas son materiales biológicos con propiedades catalíticas, es decir, que aumentan la velocidad de reacciones químicas en las células y en sistemas in vitro que de otra manera procederían muy lentamente.

Son proteínas grandes con peso molecular usualmente entre 13,000 y 500,000 daltones. El estudio de estas moléculas y los cambios en la actividad enzimática que ocurren en los líquidos corporales con el tiempo, son una herramienta diagnóstica valiosa para la elucidación de varios estados de enfermedad y pruebas de la función orgánica.

Los diferentes tejidos o materiales celulares no contienen la misma cantidad o tipos de enzimas. Cientos de enzimas en cada célula están pegadas a sus membranas y paredes, otras están disueltas en el citoplasma o secuestradas en el núcleo y otros organelos subcelulares especializadas, incluyendo microsomas, mitocondrias y lisosomas. Frecuentemente la determinación de una o varias enzimas en plasma da un patrón de actividades que es indicativo del tejido o tipo celular del cual provienen estas enzimas. Diferentes células o diferentes compartimentos dentro de una misma célula pueden contener diferentes formas de una enzima que catalizan la misma reacción química. Los ensayos para esas diferentes formas a veces pueden realizarse para determinar el tejido o compartimento de los que proviene la enzima. Hay pocas enzimas que se encuentran en el plasma u otros fluidos extracelulares donde ellas parecen cumplir una función fisiológica, pero muchas enzimas catalizan reacciones dentro de la célula o en el lumen de varios órganos.

Composición y estructura

Todas las enzimas son proteínas; es decir, son compuestos complejos de alto peso molecular; contienen cantidades de carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, y azufre similares a las encontradas en otros materiales proteicos y la hidrólisis con ácidos fuertes produce una mezcla de aminoácidos y pequeños péptidos. Las enzimas se distinguen de otras proteínas por su acción catalítica.

El comportamiento catalítico de una enzima depende de la estructura primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria de la molécula proteica, lo cual es discutido en la pág. 1042. Los cambios en la secuencia primaria de aminoácidos usualmente resultarán en diferentes estructuras tridimensionales, porque el plegamiento terciario y secundario será distinto. De la misma manera, los cambios en algunas de estas estructuras pueden afectar la actividad



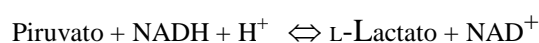
enzimática de la proteína, usualmente reduciéndola o anulándola.

Apoenzimas y cofactores

Una enzima puede tener sustancias no proteicas asociadas que le son necesarias para su actividad máxima. Estas sustancias, llamadas *cofactores*, pueden estar débil o fuertemente unidas a la porción proteica de la enzima. Los que están débilmente unidos pueden, a menudo, ser removidos por diálisis. Estos materiales pueden ser compuestos orgánicos tales como la forma oxidada de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP^+) y el fosfato de piridoxal, los que se denominan *coenzimas*, o iones inorgánicos como el cloruro (Cl^-) y el magnesio (Mg^{2+}), que son llamados *activadores*. Aquellos cofactores, como la porción hemo de la peroxidasa, que están tan fuertemente unidos que son considerados parte de la estructura de la enzima son llamados *grupos prostéticos*. Las enzimas que tienen iones metálicos muy fuertemente unidos son llamadas metaloenzimas. Dos ejemplos de *metaloenzimas* son la ferroxidasa, también llamada *ceruloplasmina*, una enzima que contiene una cantidad relativamente grande de cobre unido fuertemente y la carbonato dehidratasa, también llamada *anhidrasa carbónica*, una enzima con una gran cantidad de zinc.

El término *coenzima* es frecuentemente usado en forma inexacta para hacer referencia al compuesto NADH (o NADPH) en una reacción como es la reacción de lactato deshidrogenasa.

LD

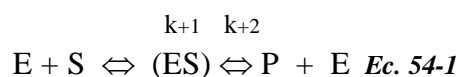


En la reacción directa, tanto el piruvato como el NADH son sustratos para la reacción enzimática y el lactato y NAD^+ son los productos. En este caso, piruvato y NADH reaccionan mol a mol. El NADH es llamado comúnmente coenzima ya que es una molécula orgánica no proteica necesaria para la actividad máxima; aunque debería ser llamado más correctamente *segundo sustrato o cosustrato*.

Ya que es posible remover por diálisis los cofactores unidos débilmente a algunas enzimas y aún éstas pueden retener cierta actividad, una enzima sin los cofactores asociados se denomina *apoenzima*, y el complejo completo enzima-cofactor es llamado *holoenzima*. En el uso clínico de los ensayos enzimáticos, la mezcla de reacción enzimática debe contener un exceso de todos los cofactores y activadores para asegurar que la forma enzimática medida sea la holoenzima y no una mezcla de las formas de holoenzima y apoenzima.

Catalizadores

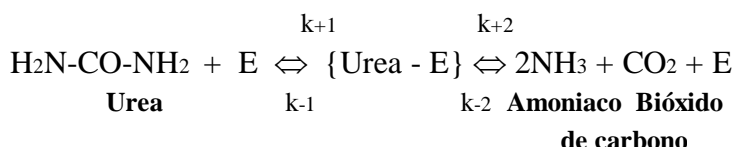
Las enzimas funcionan como catalizadores biológicos. Son proteínas que tienen la propiedad de acelerar reacciones químicas específicas próximas al equilibrio sin ser consumidas en el proceso. El material con el que reacciona la enzima es llamado el *sustrato*; y una reacción enzimática simple para un sustrato y un producto es enumerado adelante:





$k_{-1} \quad k_{-2}$

En este caso, la enzima se representa por E ; el sustrato sobre el cual actúa la enzima por S , el complejo enzima-sustrato por $\{ES\}$, y el producto de la reacción por P . Las constantes de velocidad de la reacción directa son representadas por k_{+1} y k_{+2} , mientras que las constantes de velocidad de la reacción inversa están representadas por k_{-1} y k_{-2} . Un ejemplo de la reacción de una enzima sobre un solo sustrato es la acción de la enzima ureasa sobre el sustrato urea; aunque en este caso son generados dos productos:



El agua también participa en la reacción pero no ha sido incluida por claridad. Estos catalizadores biológicos son similares a otros catalizadores químicos en muchos aspectos, excepto que funcionan en sistemas biológicos. Los catalizadores enzimáticos, aunque son inestables y se destruyen fácilmente, tienen propiedades catalíticas similares a las de otros catalizadores químicos. Éstas incluyen las siguientes: son efectivos en pequeñas concentraciones, no son modificados por la reacción, afectan la velocidad para alcanzar el equilibrio pero *no* cambian las concentraciones finales de los sustratos y productos en el equilibrio, y poseen un mayor grado de especificidad que los catalizadores químicos usuales para las reacciones que aceleran.

La primera, es la propiedad principal que hace que las enzimas sean una valiosa herramienta diagnóstica. Como son efectivas en tan pequeñas cantidades, las mediciones de los cambios en la concentración de enzimas es una manera muy sensible de seguir los cambios que ocurren en varios tipos de tejidos.

La cantidad de enzima involucrada en un ensayo enzimático es mucho menor que la cantidad de glucosa presente en un ensayo para glucosa. Un ensayo químico convencional para enzimas sería muy difícil de producir y requeriría grandes cantidades de muestra. De los varios de miles de enzimas presentes en plasma, la medición de la concentración de una sola enzima, aún cuando esté presente en un valor muy elevado, es menor que el límite de detección para la mayoría de los ensayos químicos de proteínas. El parámetro más fácil de medir y que está biológicamente relacionado a muchas condiciones clínicas es la cantidad de actividad catalítica de la enzima y cómo cambia con el tiempo.

La *actividad* de una enzima es la cantidad de sustrato para una reacción enzimática particular que es convertida a producto por unidad de tiempo bajo condiciones definidas (ver pág.1067).

Para usar la actividad como una concentración se asume que un peso dado de enzima tiene un número fijo de unidades de actividad. Esto es, la actividad específica de la enzima, en unidades por miligramo de proteína, permanece constante, aún cuando el aumento de la actividad enzimática observado durante un desorden particular pueda provenir de un tejido distinto.

Se considera que el aumento en la actividad enzimática ocurre debido a la presencia de

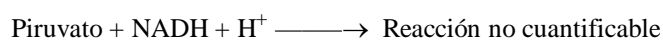
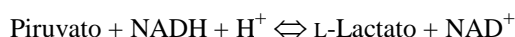


más enzima con la misma actividad específica; más que a la presencia de otras formas de la enzima con una diferente, y quizás mayor, actividad específica. En la práctica, las mediciones de la actividad enzimática son usadas como si fueran concentraciones de enzimas.

Si la enzima estuviera actuando como un catalizador, no sería modificada por la reacción, pero debido a la naturaleza inestable de la mayoría de las enzimas, esta propiedad es difícil de demostrar. En muchos ensayos en uso corriente, es posible usar tiempos de análisis muy cortos con suficiente precisión para calcular la actividad enzimática en un primer período de un ensayo y, realizarlo nuevamente, luego de diez a quince minutos sin mostrar una disminución en la actividad enzimática. La cantidad de sustrato convertida a producto durante ese tiempo podría ser 5 % a 10 % de la cantidad presente inicial. Aún cuando la actividad enzimática determinada en los dos tiempos es la misma, se concluyó que la enzima no participa mol a mol con el sustrato y está actuando como un catalizador.

Otra propiedad de los catalizadores biológicos es que aceleran la llegada al equilibrio pero no cambian la proporción final de S y P en el estado de equilibrio. Una forma de considerar este proceso es examinar el efecto de la lactato deshidrogenasa sobre la conversión de piruvato a lactato. En presencia de la enzima LD y la coenzima NADH, la conversión de piruvato a lactato ocurre rápidamente, pero sin la enzima el proceso es tan lento que apenas puede ser demostrado:

LD



Este no es un proceso de una sola dirección; en concentraciones de piruvato y lactato cercanas al equilibrio, la misma enzima convierte lactato a piruvato con la coenzima NAD^+ . La velocidad de reacción y las condiciones empleadas no son las mismas en ambas direcciones, aunque están relacionadas a la constante de equilibrio. Es posible medir la conversión en ambas direcciones, y los dos métodos son ampliamente usados para determinar la actividad de LD en el laboratorio clínico.

Sitios reactivos

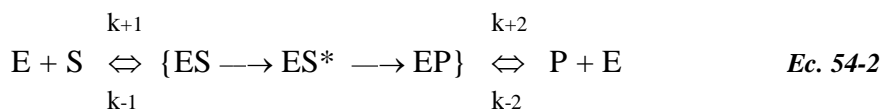
La variación de energía libre de Gibbs ($-\Delta G$) es la medida de la cantidad de trabajo que una reacción química puede producir. Todas las reacciones que se llevan a cabo desde reactivos a productos tienen una energía libre neta negativa ($-\Delta G$). Sin embargo, los reactivos no se convierten a productos directamente sino que deben absorber suficiente energía para pasar a través de un estado activado o de transición.

Las enzimas disminuyen la energía requerida para la activación al estado de transición. Sin la enzima presente, aún con una energía libre negativa favorable, es decir, con productos que tienen un $-\Delta G$ menor que la de los sustratos la reacción no puede proceder en grado apreciable (Fig. 54-1). Los reactivos deben ganar energía con el fin de superar esta barrera energética de activación para entrar al estado de transición (estado activado) y entonces convertirse en productos. Sin un catalizador presente, la reacción ocurriría únicamente si se adicionan calor o energía suficiente al sistema de reacción. Con un catalizador enzimático la



reacción puede proceder fácilmente a temperaturas fisiológicas normales.

Redefiniendo la ecuación 54-1 para explicar el estado de transición en una reacción catalizada por enzimas, encontramos que:



donde ES^* es la forma del estado de transición de los sustratos mientras que ES y EP son las formas enzima-sustrato y enzima-producto con materiales unidos pero no activados. Cuando las enzimas son usadas como catalizadores en los procesos, se encuentran reducciones sustanciales en los requerimientos de energía libre de activación. Por ejemplo, la energía libre de activación necesaria para la descomposición del peróxido de hidrógeno es 18,000 cal/mol; pero en presencia de la enzima catalasa la energía de activación es menor que 2,000 cal/mol.

Uno de los problemas más difíciles que los enzimólogos tuvieron que enfrentar fue explicar cómo una enzima puede reducir la energía de activación y al mismo tiempo permanecer sin cambios por la reacción. La ecuación 54-2 muestra esquemáticamente una posibilidad general. Para un mejor entendimiento de los mecanismos de catálisis enzimática, uno necesita un examen de los detalles de la estructura de la enzima.

Una amplia variedad de aminoácidos *hidrofóbicos* no polares e *hidrofílicos* polares están presentes en las proteínas enzimáticas. La superficie externa de la enzima, por razones de solubilidad, se cree que está compuesta de cadenas laterales de aminoácidos principalmente polares pero generalmente no reactivas. Las cadenas laterales de aminoácidos no reactivos pueden contener estructuras tales como grupos isopropilos y metilos (esto es, $R-CH_3$ y $R-CH_3-CH_3$), encontrados en alanina y leucina.

Algunas áreas de la superficie enzimática contienen aminoácidos con cadenas laterales reactivas como parte de sus estructuras. Las cadenas laterales de aminoácidos reactivos pueden contener grupos cargados tales como grupos aminos y carboxilos (que son $RCOO^-$ y RNH_3^+) encontrados en los ácidos glutámico y aspártico, o arginina y lisina. Las fracciones no cargadas como grupos sulfhidrilos e hidroxilos (que son ROH y RSH) encontrados en serina, tirosina y cisteína, son también reactivas. Existen otros tipos de grupos reactivos que están presentes en aminoácidos como histidina, los cuales tienen una estructura en anillo que presenta un nitrógeno activo. Los aminoácidos reactivos dentro de un sitio catalítico activo unen porciones de sustratos, productos, activadores, e inhibidores a través de uniones iónicas y de puentes de hidrógeno. Estas áreas reactivas de las enzimas deben estar sobre la superficie o pueden existir en muchas hendiduras ocultas en la superficie enzimática y pueden estar involucradas en los procesos catalíticos.

Hay solamente un número limitado de lugares en la enzima donde puede llevarse a cabo la catálisis. Estas áreas específicas son llamados *sitios activos* o *centros activos*, y pueden involucrar únicamente 5 a 10 aminoácidos de un total de 200 a 300 en la enzima entera. El sitio activo, que tiene propiedades catalíticas, sirve para unir el sustrato en forma específica y de esa forma facilitar la formación y la ruptura de nuevas uniones.

El sustrato está ubicado de manera tal que otros aminoácidos reactivos en el sitio activo causen la conversión de sustrato a producto.



Los sitios sobre la superficie de la enzima que unen el sustrato o el producto de la reacción son llamados *sitios de unión*. Las enzimas, particularmente aquellas de una estructura compleja compuesta de muchas subunidades, frecuentemente tienen estos sitios que están lejanos al sitio activo a lo largo de la secuencia aminoacídica primaria, pero que afectan la actividad enzimática. Estos sitios son llamados *sitios regulatorios o alostéricos*. Aunque uno esperaría gran diversidad entre los tipos de sitios catalíticos para que ocurran muchas clases de reacciones catalizadas por enzimas, se han observado algunas características comunes.

El sustrato de la reacción se une al sitio activo y es orientado de manera que una unión particular sea sujeta al ataque (Fig. 54-2). Las mitades de las cadenas laterales reactivas de la enzima interaccionan con los grupos sobre los sustratos, por lo tanto, la unión covalente es alterada para comenzar su debilitamiento. Esta unión débil disminuye la energía de activación necesaria para la reacción química. La unión débil ahora conduce a una reacción química que rompe la unión covalente y permite que se formen nuevas uniones. En este punto, el producto ya no tiene la misma afinidad por el sitio activo que el sustrato original y será liberado de la enzima.

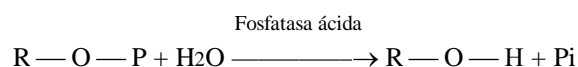
Los cambios en la secuencia de aminoácidos de la proteína podrían producir distintas enzimas presumiblemente con sitios de unión y actividad diferentes, o aun proteínas similares sin actividad catalítica. Tales cambios, causados por mutaciones genéticas, frecuentemente son la causa de *errores congénitos del metabolismo* y otras enfermedades de origen genético (ver capítulo 47).

Las reacciones químicas en las que participan estos aminoácidos reactivos no solamente definen la actividad catalítica específica de la enzima, sino que también determinan la sensibilidad de la enzima a pérdidas de actividad por factores tales como metales pesados, detergentes, o inclusive otras partes reactivas de la misma molécula proteica. Los metales pesados o detergentes pueden unirse a los grupos activos, inactivándolos.

Los cambios en la tensión superficial y la agitación vigorosa, causan desnaturalización o desdoblamiento de la proteína. Consecuentemente, las relaciones espaciales de estos aminoácidos reactivos con el resto son destruidas, previniendo que se lleve a cabo la reacción normal.

Especificidad de reacción

Se cree que las diferencias en la especificidad enzimática están relacionadas a diferencias físicas en el sitio activo. Algunas enzimas reaccionarán con algunos compuestos relacionados y se dice que tienen una amplia especificidad. La fosfatasa ácida es una de las enzimas que exhiben una amplia *especificidad de unión* porque hidrolizan muchos tipos de ésteres fosfato orgánicos como el β glicerol fosfato, timolftaleína fosfato, para nitro fenil fosfato, α -naftil fosfato. A un pH ácido, la reacción catalizada por la enzima es:



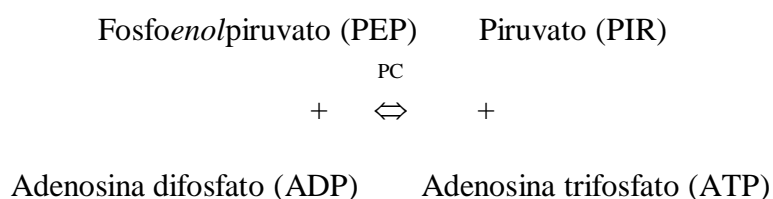
Produce un fosfato inorgánico y un alcohol orgánico.

Algunas enzimas que hidrolizan proteínas también exhiben una especificidad de unión



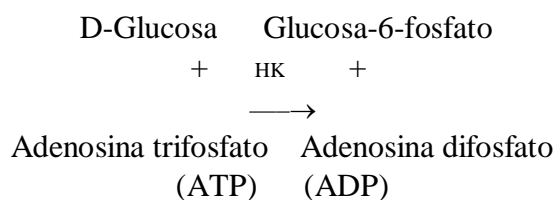
amplia, hidrolizando un gran número y variedad de uniones peptídicas dentro de un sustrato proteico. Si las uniones peptídicas del sustrato que son hidrolizadas están localizadas dentro de la proteína; la enzima es llamada *endopeptidasa*, como la pepsina A. Alternativamente, las carboxipeptidasas son enzimas que actúan sobre sustratos proteicos rompiendo uniones peptídicas, comenzando desde el carboxilo terminal del sustrato hacia el centro de la proteína. Estas enzimas son llamadas *exopeptidasas* y también exhiben una especificidad amplia por el sustrato.

En contraste a la especificidad amplia de algunas peptidasas, otras enzimas son más específicas en su acción, ellas catalizan solamente una reacción definida con pocos sustratos. En casos extremos, se ha demostrado una especificidad casi absoluta cuando un único compuesto puede servir como sustrato, como el fosfoenol piruvato para la reacción de la piruvato cinasa.



La especificidad de una enzima debe ser descrita para cada sustrato involucrado en una reacción. En contraste a la especificidad absoluta mostrada por fosfoenolpiruvato en la reacción de la piruvato cinasa; varios nucleósidos difosfatos sintéticos, como UDP, IDP, GDP, y CDP servirán como aceptores de fosfato en la reacción, en lugar del ADP. Por lo tanto, aunque se muestra una especificidad absoluta para un sustrato (PEP), un grado de especificidad intermedia se presenta para el otro sustrato (ADP).

Un grado intermedio de especificidad para cada sustrato se muestra para la reacción de la hexocinasa, en la que d-glucosa y varios otros azúcares pueden ser fosforilados como la d-manosa, 2-deoxi-d-glucosa y d-glucosamina. Sin embargo, la d-galactosa y los azúcares de cinco carbonos como la d-xilosa no son sustratos. La enzima puede también usar una variedad de nucleósidos trifosfatos como donadores de fosfatos, como ITP y GTP además del ATP.



Muchas enzimas muestran una *especificidad estereoisomérica* por la forma l o la forma d de un par de compuestos. La hexocinasa es absolutamente específica para la forma d de la glucosa; la forma l no es sustrato. La malato deshidrogenasa actúa sólo sobre la forma l del malato, y no sobre la forma d. La lactato deshidrogenasa actúa sólo sobre el l-lactato y no sobre el d-lactato. Sin embargo, la especificidad estereoisomérica no necesariamente es el medio por el cual la enzima es absolutamente específica, ya que algunas formas de lactato deshidrogenasa actúan tanto sobre lactato como sobre hidroxibutirato y como se mencionó



anteriormente, la hexocinasa funciona con varios sustratos en su forma d.

Estructura de subunidades

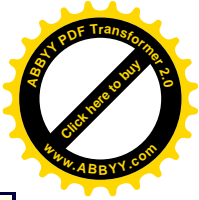
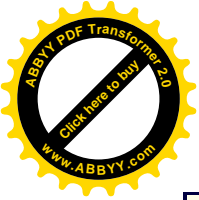
Algunas enzimas se encuentran en la naturaleza en varias formas, esto es, puede haber varios tipos de enzimas que catalizan la misma reacción. Estas se conocen como *isoenzimas* o *isozimas*. En unas pocas enzimas bien estudiadas, se encontró que las diferentes formas de isoenzimas aparecen porque las enzimas están compuestas por dos o más cadenas polipeptídicas distintas o subunidades que se unen en una forma activa. Las subunidades por sí solas no tienen las propiedades catalíticas de la enzima entera. Las isoenzimas pueden tener diferente cinética u otras propiedades físicas que permiten su diferenciación o cuantificación en una muestra. Se pueden encontrar otros tipos o clases de isoenzimas y son consideradas en la sección de isoenzimas (pág. 1077), pero las formas más ampliamente usadas clínicamente son los tipos de subunidades de las isoenzimas. Se recomienda consultar el capítulo 55 para una mayor discusión de isoenzimas.

Anabolismo y catabolismo:

Se considera que la síntesis de todas las enzimas ocurre por las vías de síntesis de proteínas intracelulares en los tejidos que contienen las enzimas. Las enzimas extracelulares como las involucradas en los procesos de coagulación son sintetizadas en hígado y vertidas al plasma. En algunos casos, otros órganos como riñón, pulmón, y páncreas también contribuyen al reservorio de enzimas extracelulares.

El mayor tamaño y complejidad de la estructura enzimática resulta en formas moleculares que son algo inestables y, por lo tanto, *lábil*. In vitro, muchas enzimas pierden su actividad catalítica con cambios relativamente leves de pH, temperatura, o aun en la concentración salina del medio que las rodea. Se presume que ocurren procesos similares intracelularmente y por consiguiente, aunque escasamente, ocurre síntesis de enzimas en un modo constante para mantener la cantidad requerida de enzimas intracelulares necesarias para el metabolismo intermediario.

Una pérdida de actividad enzimática puede ser reversible y temporal, o irreversible y permanente. La *desnaturalización* es un proceso por el cual una proteína pierde sus propiedades biológicas; es decir, pierde su actividad enzimática. Se ha sugerido que el proceso de desnaturalización es un desplegamiento o "fusión" de las cadenas peptídicas fuertemente enrolladas dando lugar a una estructura más desorganizada. Muchos experimentos sustentan esta idea, incluyendo la reactividad aumentada de cadenas laterales; cambios en la viscosidad, y cambios en la formas de sedimentación de las soluciones de proteínas. La *desnaturalización irreversible* puede ocurrir cuando las cadenas de la proteína enzimática se despliegan y son incapaces de volver a plegarse a su forma biológicamente activa, o cuando un metal pesado (como mercurio o plomo) u otros materiales se unen fuertemente al sitio activo o próximos a él. Muchos otros factores y eventos pueden conducir a la desnaturalización y pérdida de actividad, incluyendo cambios en la temperatura, la adición de ácidos o bases fuertes; la exposición a alta presión, el tratamiento con rayos ultravioletas, operaciones repetidas de congelamiento y descongelamiento, y la adición de detergentes, o solventes orgánicos, o la presencia de altas concentraciones de urea o guanidina.



Una *desnaturalización reversible*, o pérdida de la actividad enzimática, es llamada *inactivación*. Por ejemplo, la inactivación puede ocurrir si una solución de enzima es dejada demasiado tiempo a temperatura ambiente y la enzima pierde actividad parcialmente. Esta pérdida de actividad temporal puede tener varias causas, incluyendo inestabilidad al calor con la ruptura de puentes de hidrógeno, u oxidación de grupos sulfhidrilos. En ambos casos, se pierde algo de la forma estructural natural.

Con algunas enzimas, la disminución de la temperatura de la solución o la adición de agentes reductores sulfhidrilos como el ditioneitol, puede permitir a la enzima replegarse a su forma activa original con la reconstitución de puentes de hidrógeno, o la reducción de grupos sulfhidrilos oxidados, y así producir una *reactivación* de la enzima y una recuperación de la actividad perdida.

Se conoce poco acerca del mecanismo de remoción de las proteínas enzimáticas del compartimento extracelular. Probablemente las proteasas extracelulares hidrolizarían el material proteico, inactivando así a las enzimas que son liberadas de la célula. Las proteínas degradadas inactivas son luego removidas por una de las diversas rutas excretoras, como la excreción en bilis, en intestino, hígado, riñón, o sistema reticuloendotelial. En suma, es sabido que las enzimas tienen distintas vidas medias, indicando la presencia de varios mecanismos de remoción.

Clasificación Enzimática

Muchas enzimas fueron denominadas primero por su función (como lactato deshidrogenasa) pero algunas han sido denominadas por el tipo de sustrato sobre el que actúan: la ureasa hidroliza la urea, la lipasa hidroliza los lípidos y las fosfatasas actúan sobre los fosfatos inorgánicos. Muchas de las enzimas clínicamente importantes son aún conocidas por nombres triviales que surgieron de circunstancias históricas y que continuarán en la literatura debido a su simplicidad. Una convención sistemática para la nomenclatura de las enzimas fue desarrollada por la Comisión de Enzimas (EC) de la Unión Internacional de Bioquímica (IUB) y es ampliamente usada.

Nombres y códigos de la Unión Internacional de Bioquímica (IUB)

La nomenclatura sistemática de la IUB describe la reacción catalizada. La IUB también reconoce que los nombres triviales son importantes y asigna a muchas enzimas nombres prácticos pero no abreviaturas. Para cada enzima individual, el sistema da un código EC numérico que consiste de cuatro números separados por puntos. El primer número asigna a la enzima una de las seis categorías de reacciones. El segundo número denota la subclase, que a menudo está basada en el tipo de grupo, como el grupo amino o grupo hidroxilo, que participa en la reacción. El tercer número indica las diferentes subclases de reacción, frecuentemente el grupo aceptor, y el cuarto número es simplemente el número de orden de esa enzima en particular en ese sub subgrupo. Para la enzima lactato deshidrogenasa (EC 1.1.1.27), el primer número 1 indica que la enzima es una oxidorreductasa; el segundo número 1 indica que la enzima actúa en el grupo CH— de los donadores; el tercer número 1, indica

2175

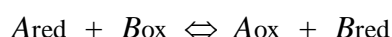


que el aceptor es NAD^+ o NADP^+ ; y el cuarto número, 27 es simplemente el número de orden de la enzima en el grupo EC 1.1.1.x

Clasificación de la Comisión de Enzimas:

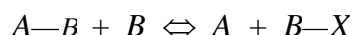
Todas las enzimas son divididas en seis clases generales, dependiendo del tipo de reacción que catalizan. Algunas enzimas clínicamente importantes se enumeran en la Tabla 54-1 con el código EC y su nombre sistemático.

La primer clase incluye las *oxidorreductasas*, aquellas enzimas que catalizan la transferencia de electrones o reacciones de oxidación-reducción, que pueden ser ilustradas esquemáticamente de la siguiente manera:



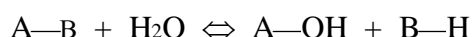
Un ejemplo de una enzima en esta categoría es la lactato deshidrogenasa (EC 1.1.1.27). Algunos nombres comunes de enzimas en esta categoría, incluyen: deshidrogenasas, reductasas, oxidasas y peroxidasas.

El segundo grupo de enzimas contiene a las *transferasas*, enzimas que catalizan la transferencia de un grupo como un amino, carboxilo, glucosilo, metilo, o grupos fosforilos de una molécula a otra. Estas reacciones pueden ser esquemáticamente enumeradas así:



La alanina aminotransferasa (EC 2.6.1.2) es un ejemplo de este grupo. Otras enzimas comunes en esta categoría incluyen cinasas y transcarboxilasas.

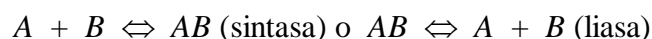
Un tercer grupo incluye a las *hidrolasas*; que catalizan la ruptura de $\text{C}-\text{O}$, $\text{C}-\text{N}$ y algunas otras uniones con la adición de agua. Estas reacciones de hidrólisis pueden ser ilustradas como sigue:



Un ejemplo de este grupo es la fosfatasa ácida (EC 3.1.1.3.2). Otras enzimas comunes en esta categoría son la amilasa, ureasa, pepsina, quimotripsina, y varias peptidasas y esterases.

Un cuarto grupo contiene a las *liasas*, que hidrolizan uniones $\text{C}-\text{C}$, $\text{C}-\text{O}$ y $\text{C}-\text{N}$ por eliminación, con formación de un doble enlace, o catalizan la reacción inversa, es decir, la adición de un grupo al doble enlace. En los casos en los que la reacción inversa es importante se usa el término *sintasa* en el nombre.

Este tipo de reacción se ilustra de la siguiente manera:

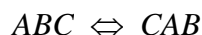


Un examen del listado de EC muestra que éstos y los grupos subsecuentes contienen relativamente pocas enzimas usadas en el diagnóstico clínico.

El quinto grupo incluye las *isomerasas*, que catalizan cambios estructurales o geométricos en una molécula. También son llamadas *epimerasas*, *isomerasas* y *mutasas*

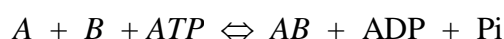


dependiendo del tipo de isomería involucrada. Esta reacción puede ser ilustrada como sigue:



Un ejemplo de este grupo es la enzima glucosa fosfato isomerasa (EC 5.3.1.9). No es comúnmente usada en el diagnóstico.

Un sexto y último grupo consiste en las *ligasas* o sintetasas. En esta reacción, dos moléculas son unidas, acopladas con la hidrólisis del pirofosfato en ATP. Muchas de estas enzimas están involucradas en la síntesis de proteínas, RNA y DNA; ninguna es usada corrientemente en el diagnóstico clínico. El tipo de reacción sintética es ilustrada de la siguiente manera:



Un ejemplo de esta reacción es la enzima glutamina sintetasa (EC 6.3.1.2), la cual es raramente usada en la clínica.

Abreviaturas no estándares

Una variedad de abreviaturas simples conteniendo cuatro o menos letras mayúsculas también son usadas para representar las enzimas que se miden rutinariamente. Estas abreviaturas son ampliamente usadas en la práctica pero *no* forman parte del sistema IUB. Son tan populares que se han vuelto de uso muy común y es muy difícil descartarlas. Estas abreviaturas son enumeradas en la Tabla 54-1.

Determinaciones Enzimáticas

En la mayoría de los procedimientos enzimáticos las velocidades de reacción no son constantes con el tiempo. Mediante la observación de la variación de absorbancia para un producto o sustrato a una longitud de onda específica, se puede monitorear la reacción. Inicialmente, hay un *período lag* con muy poca variación de absorbancia por unidad de tiempo cuando los reactivos son mezclados y alcanzan el equilibrio cinético y térmico, luego una *fase lineal* donde el cambio de absorbancia por unidad de tiempo es constante, y finalmente una *fase de agotamiento del sustrato* con pequeños cambios de absorbancia por unidad de tiempo.

Los ensayos enzimáticos deben ser realizados durante la fase lineal de cambios de absorbancia, donde se puede determinar una cantidad constante de actividad por período de tiempo (Fig. 54-3, A). Por consiguiente, las mediciones no comienzan al tiempo cero sino después que la fase lag ha ocurrido. Las mediciones pueden llevarse a cabo a cualquier tiempo durante la fase lineal y pueden continuar hasta la fase de agotamiento del sustrato.

Si la actividad enzimática es demasiado elevada, el consumo de sustrato ocurrirá antes que las mediciones hayan sido completadas. En lugar de variar el tiempo de lectura, la forma más común de manejar estas muestras con elevada actividad es diluir a la mitad a una tercera parte con solución fisiológica o agua (Fig. 54-3, B). Sin embargo, no todas las enzimas



demuestran linealidad luego de la dilución, particularmente si éstas son activas en la interfase lípido/agua, como ocurre con la lipasa (EC 3.1.1.3), o si se encuentran presentes inhibidores en la muestra, como LD (EC 1.1.1.27) cuando es medida en orina.

Uno de los métodos más convenientes para medir la actividad enzimática está basado en la medida de la absorbancia ya sea de los productos o de los sustratos. Existen algunos sistemas enzimáticos que involucran la conversión de NAD^+ a su forma reducida NADH^+ , o viceversa. La forma reducida tiene mayor absorbancia a 340 nm que la oxidada, por lo que las reacciones que interconvierten una y otra forma pueden ser monitoreadas por la medición de la variación de absorbancia a esta longitud de onda. La diferencia entre los espectros de absorbancia de los compuestos oxidados y reducidos es mostrada en la Fig. 54-4.

Ensayos enzimáticos

Las enzimas generalmente son medidas teniendo en cuenta sus propiedades catalíticas o inmunoquímicas. Los dos métodos más comúnmente empleados basados en las propiedades catalíticas, son el método de un punto a tiempo fijo, algunas veces llamado de *punto final*, y los ensayos a tiempo fijo de múltiples puntos, llamado *método cinético*.

Los ensayos de punto final son usados todavía en algunos casos, pero en general se emplean períodos más cortos. En estos ensayos, una reacción es iniciada e incubada a una temperatura constante a un tiempo fijo, por ejemplo 30 minutos. La reacción entonces es detenida, normalmente por la adición de otro reactivo, y se mide la cantidad de producto. En este tipo de ensayos, se asume que se genera una cantidad constante de producto a lo largo del período del ensayo completo.

Si la velocidad de reacción es seguida de manera continua o utilizando varios puntos, en función del tiempo, el ensayo se denomina *ensayo cinético*. Usualmente el tiempo de reacción es corto, es decir de unos pocos segundos a unos pocos minutos, y existe poco peligro de degradación enzimática. El término ensayo cinético es también usado para describir reacciones que forman cantidades crecientes de producto con el tiempo; las reacciones pueden ser monitoreadas como *ensayos de punto final* de un punto o *ensayos de múltiples puntos* (monitoreo continuo). Aunque la terminología de este método cinético no es estrictamente correcta, los ensayos de múltiples puntos o continuos son superiores a los de un solo punto, ya que es más fácil demostrar una linealidad aproximada de la reacción sobre el período entero de medición.

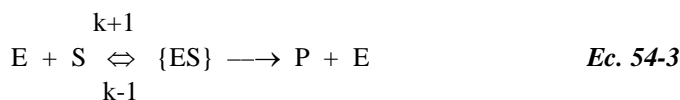
Principios de análisis cinéticos

La *cinética enzimática* es el estudio de las velocidades de reacción de la enzima y los factores que la afectan. Inicialmente, se hicieron varios experimentos para examinar los efectos de distintas condiciones del ensayo sobre la medición de la actividad de la enzima. Finalmente, una serie de condiciones específicas son definidas para establecer la velocidad máxima de la actividad enzimática.

La reacción enzimática general dada previamente para una *reacción de un sólo sustrato* puede ser cambiar ligeramente para las *velocidades iniciales*, como en la ecuación 54-3. En este caso, la cantidad de producto es muy pequeña y la reacción inversa de P combinándose con E para formar {ES} es ignorada, ya que se van a realizar las mediciones de



la velocidad inicial. La velocidad inicial, es la velocidad al comienzo de la reacción, después del período lag y durante la fase lineal en la Fig. 54-5A, pero antes de la formación sustancial de producto.



Para una cantidad de enzima dada, la velocidad de actividad que se observa se incrementa al aumentar la cantidad de sustrato, como se muestra en la Fig. 54-5. A bajas concentraciones de sustrato, la velocidad depende linealmente de la cantidad de sustrato, es decir, es una reacción *primer orden*, pero a altas concentraciones de sustrato la velocidad es esencialmente independiente de la concentración de sustrato, o sea, es una reacción de *orden cero*. Una descripción matemática de la reacción podría explicar cómo la reacción puede ser de primer orden a baja concentración de sustrato y de orden cero a altas concentraciones de sustrato.

Si la enzima tiene un número limitado de sitios activos, a bajas concentraciones de sustrato la velocidad será dependiente de la cantidad de sustrato presente, ya que habrá una gran concentración efectiva de sitios activos incompletos. Sin embargo, ya que el número total de sitios en la enzima es limitado y la cantidad de enzima es constante, entonces, cuando la cantidad de sustrato es incrementada, los sitios comenzarán a saturarse con sustrato hasta que la reacción será independiente de la concentración de sustrato. A estas concentraciones altas de sustrato todos los sitios activos de la enzima están llenos y la reacción procede a máxima velocidad. Pequeños cambios en la concentración de sustrato después de la saturación no afectarán la velocidad enzimática.

La segunda etapa, la formación de producto, se considera como la etapa limitante de la velocidad o la que determina la actividad total. El equilibrio para la formación del complejo ES puede ser escrito como sigue con la concentración molar de todas las especies reactivas expresadas entre paréntesis:

$$K_{eq} = \frac{k_{+1} [E] [S]}{k_{-1} [ES]} = \frac{[ES]}{[E] [S]}$$

La constante de equilibrio, K_{eq} es igual al cociente de la constante de velocidad de la reacción directa sobre la constante de la reacción inversa. De la ecuación 54-3, la velocidad de formación del producto P es la cantidad de $[ES]$ multiplicada por la velocidad k_{+2} a la cual el complejo enzimático es convertido a $E+P$. Por lo tanto, la velocidad de formación del producto es:

$$\text{Velocidad o tasa} = [ES] \times k_{+2}$$

Ya que la velocidad es la cantidad de producto formado en un período de tiempo:

$$\text{Velocidad} = \frac{\Delta P}{\Delta T} = [ES] \times k_{+2}$$



y sustituyendo $K_{eq}[E][S]$ por $[ES]$ y reordenando se obtiene:

$$\Delta P = K_{eq} \times [S] \times [E] \times k_{+2} \times \Delta T$$

La cantidad de producto formado es proporcional a la cantidad de enzima presente, el tiempo de ensayo, y la cantidad de sustrato presente. Cuando la constante de proporcionalidad es sustituida por las constantes de velocidad, la ecuación es:

$$\Delta P = K_1 \times [S] \times [E] \times \Delta T$$

donde ΔP es la cantidad de producto formado durante el tiempo de ensayo, $[E]$ es la cantidad de enzima, $[S]$ es la cantidad de sustrato, ΔT es el tiempo de ensayo, y K_1 es una constante de proporcionalidad. La actividad enzimática o velocidad de formación de producto con el tiempo, entonces está dada por:

$$\text{Velocidad} = \frac{\Delta P}{\Delta T} = K_1 \times [S] \times [E]$$

Usualmente los ensayos enzimáticos son realizados a una alta concentración de sustrato por un período de tiempo lo suficientemente corto como para que la concentración de sustrato puede considerarse como constante. El valor de esta concentración constante de sustrato puede ser combinado con K_1 para producir una segunda constante de proporcionalidad, K_2 , la cual es el producto de K_1 por la concentración de sustrato.

El cociente puede ser luego expresado para que sea solamente dependiente de la cantidad de enzima presente, eso es, una reacción de orden cero, independiente de la concentración de sustrato.

$$\text{Velocidad} = \frac{\Delta P}{\Delta T} = K_2 \times [E]$$

Esta tasa de reacción, o velocidad, generalmente es llamada v , o V_i , o V_0 , en la literatura referente a cinética enzimática.

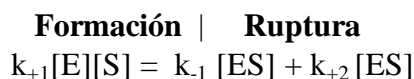
K_m y $V_{m\acute{a}x}$

La actividad enzimática, esto es, la tasa o velocidad, depende de la concentración de sustrato cuando la cantidad de sustrato es baja con relación a la cantidad de enzima presente en el ensayo. Esta relación para una reacción de un sólo sustrato se muestra gráficamente en la Fig. 54-5, con la misma concentración de enzima ensayada a varias concentraciones diferentes de sustrato.

En un estado estable, antes de que esté presente demasiado producto, la velocidad de formación del complejo $[ES]$ será igual a la velocidad de ruptura. Uno puede escribir esto



usando la siguiente ecuación.



Agrupando y reordenando los términos, uno puede remover las constantes de velocidad y una constante K_m es definida.

$$\frac{[ES]}{[E][S]} = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}} = K_m \quad \text{Ec. 54-4}$$

El cociente o velocidad de formación de producto, v , a un tiempo dado, y la concentración de enzima libre, $[E]$, son descritas por:

$$v = k_{+2}[ES] \quad \text{y} \quad [E] = [Et] - [ES]$$

donde $[Et]$ es la cantidad total de enzima y $[ES]$ es la cantidad acomplejada con sustrato. Cuando toda la enzima está presente en la forma de $[ES]$ (esto es, a muy alta $[S]$ en una reacción de orden cero), la velocidad máxima, $V_{m\acute{a}x}$, es la siguiente:

$$V_{m\acute{a}x} = k_{+2}[Et]$$

Combinando las tres ecuaciones anteriores, se obtiene:

$$[E] = \frac{V_{m\acute{a}x}}{k_{+2}} - \frac{v}{k_{+2}} = \frac{V_{m\acute{a}x} - v}{k_{+2}}$$

De la ecuación 54-4:

$$[E] = \frac{K_m [ES]}{[S]} \quad \text{y} \quad [ES] = \frac{v}{k_{+2}}$$

Entonces:

$$[E] = \frac{K_m [ES]}{[S]} = \frac{V_{m\acute{a}x} - v}{k_{+2}} \quad \text{o} \quad \frac{K_m \times v}{[S] \times k_{+2}} = \frac{V_{m\acute{a}x} - v}{k_{+2}}$$

Reordenando se obtiene:

$$K_m \times v = (V_{m\acute{a}x} - v)[S] \quad \text{o} \quad v(K_m + [S]) = V_{m\acute{a}x}[S]$$

Cuando esta ecuación es resuelta para v , da la *ecuación de Michaelis-Menten*, la cual es la



ecuación para la hipérbola rectangular mostrada en la Fig. 54-5A.

$$v = \frac{V_{\text{máx}} [S]}{K_m + [S]}$$

$[S]$ es la concentración de sustrato, v es la velocidad, $V_{\text{máx}}$ es la velocidad máxima de reacción cuando la enzima está saturada con el sustrato, y K_m , la constante de Michaelis-Menten, es la concentración de sustrato que produce la mitad de la velocidad máxima.

A la alta concentración fija de sustrato encontrada en los ensayos usuales del laboratorio clínico, la velocidad, v , se aproxima a $V_{\text{máx}}$ y es proporcional a la cantidad de enzima presente, ya que los demás factores son constantes. Se dice que a reacción es de orden cero con respecto al sustrato, es decir, es independiente de la concentración de sustrato. La condición común usada para ensayar actividad enzimática es una alta concentración de sustrato donde $[S] \cong K_m$ o mayor. La velocidad a una concentración de sustrato de $10 \times K_m$ está dada por la siguiente ecuación:

$$v = \frac{V_{\text{máx}}(10 \times K_m)}{K_m + (10 \times K_m)} = V_{\text{máx}} \frac{10 \times K_m}{11 \times K_m} = 0.91 V_{\text{máx}}$$

Por lo tanto, a $[S] = 10 \times K_m$ la velocidad producida es mayor que el 90% de $V_{\text{máx}}$.

Otra manera de analizar la ecuación de Michaelis-Menten es ver si es consistente con una cinética de primer orden a bajas concentraciones de sustrato y con una cinética de orden cero a una alta concentración de sustrato.

A bajas concentraciones de sustrato donde $[S] \ll K_m$:

$$v = \frac{V_{\text{máx}} [S]}{K_m + [S]} \cong \frac{V_{\text{máx}} [S]}{K_m}$$

y ya que K_m y $V_{\text{máx}}$ son constantes:

$$v = K_1 [S]$$

muestra que la velocidad es dependiente de la primera potencia de la concentración del sustrato

A altas concentraciones de sustrato donde $[S] \gg K_m$,

$$v = \frac{V_{\text{máx}} [S]}{K_m + [S]} \cong \frac{V_{\text{máx}} [S]}{[S]} = V_{\text{máx}}$$

se muestra que la velocidad (v) no depende de la concentración de sustrato.

Como muestra la Fig. 54-5A. La relación de concentración de sustrato a la actividad enzimática es una curva que generalmente es similar a una hipérbola rectangular. Para reacciones enzimáticas de múltiples sustratos las cinéticas son más complejas. La presencia de



activadores e inhibidores actuando en sitios alostéricos o regulatorios tienden a hacer las curvas menos lineales debido a las cinéticas complejas.

La determinación exacta de K_m y V_{max} para cada sustrato o activador de las curvas de Michaelis-Menten tal como se muestra en la Fig. 54-5A, es muy difícil, aun si las curvas son bastante lineales. Sin embargo, es necesario determinar esas constantes de manera que los ensayos puedan ser establecidos usando condiciones óptimas para medir correctamente la actividad enzimática. Si la curva es transformada en una línea recta, la K_m y V_{max} pueden ser determinadas con mayor exactitud. Uno puede transformar la ecuación de Michaelis-Menten matemáticamente y obtener la ecuación de una línea recta e interpolar usando estas ecuaciones transformadas. Las presentaciones gráficas comunes se muestran en la Fig. 54-6.

Cálculo de la actividad enzimática

Los resultados de una determinación enzimática son expresados como unidades de *actividad* en términos de la cantidad de producto formado por unidad de tiempo bajo condiciones definidas para un volumen dado de muestra, el cual generalmente es suero. Por lo tanto, una unidad de actividad enzimática sería la cantidad de enzima que debería, bajo ciertas condiciones especificadas, causar la formación de 1 mg de producto, P, por minuto cuando 1 mL de muestra es usado. En procedimientos antiguos a menudo se usaban unidades arbitrarias similares.

En 1961 la Comisión de Enzimas recomendó la adopción de una unidad internacional (UI) de actividad enzimática. La UI fue definida como la cantidad de enzima que podía convertir 1 micromol de sustrato por minuto bajo condiciones estándares.

$$1 \text{ UI} = 1 \text{ micromol/minuto}$$

En aquellos casos donde una molécula de sustrato es transformada en dos o más moléculas de producto, la definición es por micromol de producto formado.

Esta unidad ha sido ampliamente adoptada, y en algunos aspectos tiene unidades de ensayo estandarizadas. No se ha reducido el número de intervalos de referencia debido a que si las condiciones estándares cambian, la actividad aparente de la enzima cambia. Por ejemplo, si se usa un nuevo amortiguador en el ensayo, esto puede afectar la velocidad enzimática y producir un intervalo de referencia diferente.

El Sistema Internacional de Unidades (SI), originalmente adoptado por la Organización Mundial de la Salud, estableció como unidad de actividad enzimática al katal (K). Éste es definido como 1 mol/seg de sustrato transformado. Esta unidad es demasiado grande para ser útil clínicamente, y tuvo poca aceptación en los Estados Unidos aunque fue recomendado por la EC en 1972.

Para convertir unidades internacionales a katal:

$$1 \text{ UI} = \frac{\text{Micromol}}{\text{Minuto}} \times \frac{10^{-6} \text{ Moles}}{\text{Micromol}} \times \frac{1 \text{ min}}{60 \text{ seg}} = 1.67 \times 10^{-8} \text{ K}$$



Por lo tanto, 1.0 UI = 16.7 nK (nanokatales). Solamente las unidades internacionales UI han sido ampliamente adoptadas por los trabajadores en el campo de la enzimología clínica. El katal no ha tenido una aceptación general.

Los materiales enzimáticos humanos puros no son accesibles y por eso los ensayos enzimáticos no pueden ser estandarizados en cada laboratorio por calibración con materiales puros. Pueden usarse otros métodos de estandarización de los ensayos enzimáticos. El método alternativo que es usado más ampliamente depende de tener un espectrofotómetro calibrado apropiadamente. Muchos ensayos enzimáticos son seguidos por medidas espectrofotométricas realizadas a una determinada longitud de onda. Con un método espectrofotométrico generalmente uno asume que a 340 nm, el NADH tiene un coeficiente de absorción molar, ϵ , de

$$A/(l \times c) = 6.22 \times 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

donde A es la absorbancia real de una solución, l es el paso de luz en centímetros a través de la solución, y c es la concentración en moles por litro de la sustancia absorbente (ver capítulo 4). En el caso se una trayectoria de 1 cm de paso de luz, se puede reordenar para c :

$$c = A \times 10^{-3} / 6.22 \text{ mol/L}$$

Cuando la concentración está expresada en micromoles por litro en lugar de moles por litro, la expresión es:

$$c = A \times 10^3 / 6.22 \text{ } \mu\text{mol/L}$$

A partir del cambio de absorbancia que fue medido y el volumen de solución usada, uno puede calcular realmente el número de micromoles de NADH formado o usado durante el período de medición de la enzima.

$$c = \Delta A \times 10^3 / 6.22 \text{ } \mu\text{mol/L}$$

Por ejemplo, en la reacción de lactato deshidrogenasa, si se observa un cambio en la absorbancia de 0.06 a 340 nm en una cubeta de 1 cm y si se usó una muestra de 0.1 mL con un volumen total de ensayo de 3.0 mL, el cálculo de actividad sería el siguiente:

$$\text{Unidades internacionales/L} = \frac{0.06 \times 1000 \text{ } \mu\text{mol/mmol} \times 3.0 \text{ mL}}{6.22 \text{ mmol/L} \times 0.1 \text{ mL}} = 289 \text{ UI/mL}$$

Las dos unidades enzimáticas que han sido descritas expresan la actividad en términos de unidades por volumen de muestra. Esta es una unidad de medida particularmente conveniente en el laboratorio clínico cuando uno está ensayando enzimas en fluidos biológicos como suero o plasma. Si uno está midiendo una enzima que se encuentra en eritrocitos (GR) o en glóbulos blancos (GB), se necesitan otras unidades de medida. En el caso de enzimas de GR



y GB, la actividad enzimática puede ser expresada como unidades por 10^{10} células.

En laboratorios bioquímicos donde la purificación de enzimas es importante, la actividad puede ser expresada como miligramos de proteína o como peso seco de células o como microgramos de DNA, pero éstas no son unidades convenientes para el laboratorio clínico.

Factores analíticos que afectan la medición de enzimas:

La velocidad de las reacciones que involucran enzimas está fuertemente influenciada por la temperatura, pH, concentración de sustrato, y varios otros factores. Por consiguiente, todos los detalles de un procedimiento dado deberían ser seguidos exactamente para producir resultados precisos y exactos.

Los ensayos de actividad enzimática deben ser llevados a cabo bajo condiciones óptimas de cinética de orden cero y de esta manera, la velocidad medida es dependiente sólo de la cantidad de enzima presente. Para optimizar un ensayo como la reacción de lactato deshidrogenasa dada anteriormente, se implementan una serie de reacciones con concentraciones crecientes de lactato pero con una alta concentración fija de NAD^+ y una cantidad fija de enzima.

Las actividades enzimáticas son luego medidas y se construye una gráfica similar a la de la Fig. 54-6. Luego se realiza una segunda serie de ensayos con cantidades crecientes de NAD^+ pero con la concentración alta de lactato determinada en el primer experimento; esto es, $[\text{S}] \cong 10 K_m$ para el lactato, y la misma cantidad de enzima presente. Las velocidades enzimáticas son determinadas nuevamente y se crea otra gráfica para determinar la K_m para el NAD^+ . Este mismo tipo de experimento es llevado a cabo para cada parámetro de la mezcla de reacción (como iones metálicos, pH, amortiguador) hasta que todas las variables hayan sido evaluadas para la producción de máxima actividad enzimática. Las condiciones finales determinadas de este conjunto de experimentos serán las *condiciones óptimas* del ensayo. Los experimentos para determinar las condiciones óptimas de ensayo han sido llevados a cabo para las enzimas corrientes de importancia clínica; y los estuches diagnósticos son accesibles comercialmente con todos los materiales a las concentraciones usualmente óptimas.

pH

Los cambios en el pH afectarán considerablemente la velocidad de reacción enzimática. La mayoría de las enzimas tienen un rango de pH definido en el cual la enzima es más activa. Un pH cercano al centro del rango es usualmente especificado para la determinación de una enzima particular. El pH óptimo es distinto para las diferentes enzimas. A valores de pH mayores o menores que el óptimo se observa una actividad reducida.

En la Fig. 54-7 se muestra una curva característica de pH y actividad enzimática. Es una curva con forma de campana que muestra los cambios en la actividad enzimática con respecto al pH.

A valores de pH diferentes al óptimo, la actividad enzimática puede estar afectada debido a cambios en la estructura de la enzima. Estos cambios pueden ocurrir en el sitio activo, o pueden resultar de cambios conformacionales que afectan la estructura



tridimensional.

Como el sitio activo de la enzima a menudo contiene residuos de aminoácidos ionizables, como RCOO^- o RNH_3^+ ; un cambio significativo en el pH puede conducir a la ganancia o pérdida de un protón. El resultado será un cambio sustancial en la carga superficial del sitio activo. El sitio activo podría, entonces, perder la capacidad de atraer un sustrato con carga opuesta. Una pérdida similar de actividad ocurrirá si el cambio en la carga fuera en la molécula del sustrato en lugar de la enzima. Un cambio de pH podría llevar a un desplegamiento de la enzima y pérdida de la actividad si el efecto de dicho cambio de pH rompiera los puentes de hidrógeno y otras fuerzas intramoleculares que mantienen a la enzima en una conformación activa.

Amortiguadores:

En muchos casos, a medida que ocurre la reacción enzimática, se forman productos que tienden a alterar el pH. La mayoría de los ensayos incluyen un amortiguador para mantener el ensayo en el rango óptimo de pH. El amortiguador elegido debe tener un pK_a dentro de una unidad de pH del pH óptimo de la enzima para ejercer un efectivo control.

Los amortiguadores no sólo sirven para regular el pH de un ensayo, sino que también participan en la reacción. El ensayo de fosfatasa alcalina (FAL, EC 3.1.3.1) con *p*-nitrofenil fosfato como sustrato usa el amortiguador 2-amino-2-metil propanol (AMP) para mantener el pH a 10.2. La enzima hidroliza el sustrato en fosfato inorgánico y *p*-nitrofenol en un proceso de varias etapas; parte del cual involucra una fosforilación temporal de la enzima. La etapa final y limitante de la reacción incluye la hidrólisis del fosfato unido a la enzima para regenerar la enzima libre. A valores similares de pH, los amortiguadores que actúan como aceptores de fosfato en un proceso de transfosforilación con la enzima, producirán mayores actividades de fosfatasa alcalina que cuando se usan amortiguadores que no actúan como aceptores de fosfatos. Por esto, el amortiguador AMP produce mayores velocidades de actividad de fosfatasa alcalina que cuando se usa como amortiguador glicilglicina a $\text{pH}=10.2$, dado que el AMP es un aceptor de fosfatos. En el caso de los amortiguadores que no participan en la reacción, la concentración de amortiguador que produce máxima actividad enzimática al pH óptimo también debe ser determinada experimentalmente.

Se ha encontrado que el amortiguador y ciertas sales puedan tener un efecto inusual en la K_m . Cuando el cociente amortiguador/sustrato es muy grande; el amortiguador puede competir con el sustrato por la enzima haciendo parecer que la actividad enzimática está relacionada con la concentración de sustrato en forma no lineal. Esto se ha observado con el NADH en la reacción de LD. En este caso, el cociente molar amortiguador/sustrato es $10^4:1$ y la velocidad de reacción es afectada por los amortiguadores Tris, fosfato, y NH_4HCO_3 , además de ciertas sales como NaCl y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, que están a menudo en las enzimas auxiliares o acoplantes usadas para efectuar los ensayos. Esto parece no tener efecto a concentraciones de amortiguador menores que 0.05 moles/L; lo cual es consistente con varias recomendaciones para las condiciones óptimas del ensayo de LD. Parecería prudente mantener una concentración de amortiguador lo más baja posible sin comprometer la estabilidad del pH o la velocidad enzimática.



Cofactores:

Muchas enzimas requieren un material no proteico, a menudo dializable, para su actividad máxima. Algunos de estos materiales están relacionados con ciertas estructuras de vitaminas. Por ejemplo, la tiamina o vitamina B₁, puede ser convertida a pirofosfato de tiamina, un cofactor en muchas reacciones de descarboxilación. La niacina puede convertirse a nicotinamida adenina dinucleótido y la vitamina B₁₂, rivo flavina, puede convertirse a flavina adenina dinucleótido. Ambos compuestos participan en muchas reacciones de deshidrogenación. La piridoxina, vitamina B₆, es modificada a fosfato de piridoxal que es utilizada en muchas reacciones de transaminación.

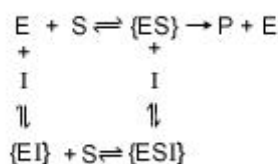
En los ensayos analíticos de actividad de transaminasas, el 5-fosfato de piridoxal es un ejemplo de un cofactor fuertemente unido que no es un sustrato. La concentración óptima de un cofactor es determinada de la misma forma que un sustrato; por eso las condiciones de ensayo pueden ser establecidas con una concentración de cofactor de aproximadamente 10 K_m o mayor.

Activadores e inhibidores

Muchas enzimas requieren iones para alcanzar su máxima actividad. Todas las enzimas que transfieren fosfato, como la hexocinasa, requieren iones magnesio (Mg^{2+}). Otros iones metálicos activadores comunes son el manganeso (Mn^{2+}), calcio (Ca^{2+}), Zinc (Zn^{2+}); hierro (Fe^{2+}) y el potasio (K^+). La amilasa requiere cloruro (Cl^-) para su máxima actividad; y hay enzimas que requieren varios iones para desarrollar su actividad máxima, por ejemplo, la piruvato cinasa requiere magnesio (Mg^{2+}) y potasio (K^+). En cada caso, la concentración óptima del activador deberá ser determinada, tal como es determinada la concentración del sustrato.

Los inhibidores son materiales que disminuyen la actividad catalítica de una enzima. Hay muchos tipos de inhibidores y varias clases de inhibición. Los inhibidores pueden actuar removiendo un activador por quelación; por ejemplo; Ca^{2+} y Mg^{2+} son removidos por EDTA u oxalato para causar la inhibición de la hexocinasa. También pueden actuar uniéndose al sitio activo para competir con el sustrato o por formación de un complejo en un sitio diferente, esto es, un sitio alostérico, lo cual afecta la actividad enzimática.

Los inhibidores son clasificados en tres grupos principales. Los *inhibidores competitivos* se unen al sitio activo y compiten con el sustrato por los sitios de unión. Estos materiales muestran una inhibición reversible que a menudo puede reducirse usando una concentración de sustrato mayor.

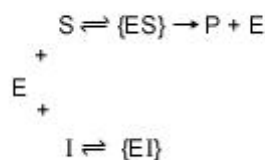


La velocidad máxima de reacción no es afectada si hay suficiente sustrato debido a la reversibilidad de las reacciones. La unión del sustrato es afectada y por eso la K_m aparente



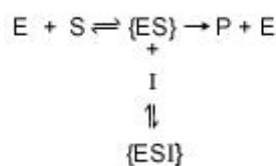
será mayor aunque la $V_{\text{máx}}$ permanezca sin cambio.

Los *inhibidores no competitivos* se unen a un sitio regulatorio o alostérico. Estos inhibidores no pueden revertirse por la adición de más sustrato, porque se unen en un lugar diferente de la superficie de la enzima.



Como el inhibidor no compite con el sustrato, la K_m no estará afectada pero la cantidad de E o ES que convierte el sustrato a producto estará disminuído y consecuentemente la $V_{\text{máx}}$ será menor.

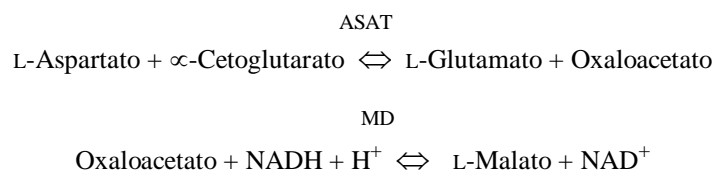
Los *inhibidores acompetitivos*, un tercer grupo de inhibidores son aquellos que se unen al complejo enzima sustrato y no a la enzima libre. En este caso, a bajas concentraciones de sustrato, la adición de más sustrato aumenta la inhibición pues se produce más complejo enzima sustrato que reacciona con el inhibidor. El resultado de este tipo de inhibición es que la $V_{\text{máx}}$ disminuye y la K_m aumenta.



El tipo de inhibición que una sustancia ejerce puede ser determinada cuando uno examina los resultados de los estudios cinéticos, con y sin inhibidores, usando una gráfica lineal de actividad enzimática como se muestra en la Fig. 54-8. Un breve resumen de los efectos de los tipos de inhibición se da en la Tabla 54-2. El tipo de inhibición puede ser clasificado por observación de los efectos cinéticos sobre la $V_{\text{máx}}$ y la K_m .

Enzimas acoplantes

Algunas reacciones enzimáticas de interés, como las de la alanina aminotransferasa (ALAT) y aspartato aminotransferasa (ASAT) no tienen sustratos ni forman productos que puedan ser monitoreados directamente. Uno debe acoplar la reacción enzimática inicial a una segunda *reacción enzimática indicadora* que, por ejemplo, incluya la conversión NAD^+/NADH para hacer un ensayo conveniente. La reacción enzimática de la ASAT puede ser acoplada con la reacción de la malato deshidrogenasa (MD; EC 1.1.1.37).





Esto da la siguiente reacción neta:



En este caso, el sustrato para la segunda reacción, el oxaloacetato, es el producto de la primera reacción. El oxaloacetato de la reacción de ASAT y el cofactor NADH sirven como sustrato para la reacción de la malato deshidrogenasa. Este ensayo tendrá l-aspartato, α -cetoglutarato, NADH y la enzima malato deshidrogenasa (MD) presente en gran exceso por lo que el factor limitante de la velocidad de reacción será la cantidad de ASAT en la muestra. Para otras enzimas, como la creatina cinasa (CC; EC 2.7.3.2), la medición de la primera enzima requiere una reacción *enzimática auxiliar intermediaria* y luego una *enzima indicadora*. En la medida de CC, la hexocinasa (EC 2.7.1.1) es usada como una *enzima auxiliar* y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (EC 1.1.1.49) es usada como *enzima indicadora*. Estas dos enzimas adicionales tendrán que estar presentes en gran exceso para medir correctamente la CC. Es difícil establecer ensayos óptimos que tengan más de dos reacciones acopladas debido al gran número de componentes en el sistema y a los problemas que conlleva la optimización de todos los componentes sin causar inhibición de la reacción limitante.

Temperatura

No hay una temperatura óptima para los ensayos enzimáticos. La mayoría de las enzimas aumentan su actividad a medida que la temperatura se eleva por encima de un rango limitado de temperatura, como puede ser de 10° a 40° C; un ejemplo se muestra en la Fig. 54-9.

Para minimizar cualquier pérdida de actividad debido a que la enzima no es determinada inmediatamente después de ser tomada la muestra, se deben conservar las muestras en refrigeración, a temperatura de 2° a 6° C; o en congelador (Tabla 54-3). Se ha encontrado en algunos casos que ciertas formas enzimáticas como la LD₄ y LD₅, resultaron ser más estables a temperatura ambiente que refrigeradas. El congelamiento y descongelamiento repetido de una muestra causará a menudo desnaturalización y pérdida de actividad enzimática. Por encima de 40 °C, la mayoría de las enzimas son rápidamente desnaturalizadas y pierden casi toda su actividad en poco tiempo. Una excepción a esta regla general es la amilasa, que parece ser más estable hasta alrededor de los 60° C antes de que ocurra una pérdida significativa de actividad.

Para muchas enzimas, el cambio de un grado Celsius de temperatura producirá una variación del 10 % en la actividad. Se recomienda una tolerancia de ± 0.1 grados Celsius para el control de temperatura de un análisis enzimático, ya que esto producirá aproximadamente una variación de $\pm 1\%$ en la actividad medida. Esta variación será lo suficientemente pequeña por lo que se puede considerar como una fuente de error insignificante en el trabajo clínico. Se ha sugerido una recomendación de ± 0.05 grados Celsius en el control de temperatura, el cual podría disminuir la variación en la actividad a $\pm 0.5\%$.

El aumento aparente en la actividad con el aumento de la temperatura significa que los ensayos sean realizados a temperaturas mayores, como 37° C; serán más sensibles a pequeños



cambios en la cantidad de enzima de la muestra. Las enzimas que se usan comúnmente en el diagnóstico clínico son menos estables a esta temperatura que a 25° ó a 30° C y, por eso, los ensayos llevados a cabo a 37° C deben ser realizados en tiempos relativamente cortos con el fin de minimizar la desnaturalización de la enzima.

Los argumentos para el uso de temperaturas mayores, 37° C, y menores, 25° C se han presentado principalmente con base a un razonamiento científico y técnico. Un compromiso razonable parece ser la medición a 30° C, que es la recomendación de la Federación Internacional de Química Clínica (más ampliamente conocida bajo su abreviatura inglesa IFCC, por "International Federation of Clinical Chemistry"). En la actualidad, existe un estándar de galio muy exacto del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología, que está accesible a todos los laboratorios. Este material tiene un plateau de temperatura de fusión de 29.772° C y puede usarse para calibrar o verificar la temperatura de trabajo de una amplia variedad de instrumentos.

Definición de las condiciones de ensayo

Aunque se pueden establecer las condiciones óptimas para el ensayo de una enzima, está claro que no todas las determinaciones pueden llevarse a cabo óptimamente. A veces, las diferencias entre los ensayos no parecen significativas y aun así los resultados obtenidos serán sustancialmente distintos. El efecto entre los diversos componentes de un ensayo, y por lo tanto, el resultado, es todavía más significativo cuando se considera un ensayo acoplado. En estos ensayos no solamente tienen que considerarse las concentraciones de sustratos y activadores de la reacción primaria, sino también deben tener un exceso de enzimas indicadoras y auxiliares y de sus activadores asociados.

La alanina aminotransferasa (ALAT) es frecuentemente medida en un ensayo que contiene un exceso de lactato deshidrogenasa y NADH, más l-alanina, alfa cetoglutarato y amortiguador. El estuche disponible comercialmente a menudo especifica que cerca de 500 U/L de LD están presentes como una enzima indicadora y, tal vez, la fuente animal de la cual proviene esta enzima. Esto no es suficiente para definir el ensayo completamente, debido a que la K_m del piruvato varía con el tipo de isoenzima de LD.

Se requerirán cerca de cuatro veces más unidades de M_4 -LD₁ que si se usara H_4 -LD₅ para obtener una velocidad de reacción equivalente. Una mezcla cruda de isoenzimas estará entre estos extremos. Aun sí las unidades de LD agregadas a diferentes ensayos comerciales fueran las mismas, la medida de las velocidades enzimáticas podrían variar con cada lote de un estuche sí la enzima indicadora fuera adicionada independientemente del contenido de la isoenzima. La misma clase de variabilidad ocurrirá entre estuches que contienen la misma concentración de sustratos, activadores, y unidades de LD, sí la enzima indicadora usada proviniera de una fuente diferente, como la bacteriana. Es por esta razón que el intervalo de referencia para cada ensayo enzimático deberá ser verificado por cada laboratorio, particularmente cuando se cambian los fabricantes que suministran los reactivos.

Enzimas como reactivos

Es posible medir los niveles séricos del sustrato de muchas reacciones enzimáticas usando muchos de los principios de cinética enzimática aplicados de una manera ligeramente



diferente. La actividad enzimática a bajas concentraciones de sustrato es de primer orden, es decir, es lineal con respecto a la concentración de sustrato. Para medir la concentración de piruvato en una muestra, por ejemplo, se deberá preparar una mezcla de ensayo especial, con sólo una pequeña cantidad de la muestra agregada de manera que la cantidad de piruvato desconocida en el ensayo sea baja, esto es, menor que la K_m . Se debe usar una mezcla de ensayo que contenga un exceso de LD, un exceso de la coenzima NADH, la cantidad de piruvato presente y un amortiguador. La reducción en la cantidad de NADH en este ensayo está relacionada con la cantidad de piruvato presente y el coeficiente de absorción milimolar de NADH a 340 nm. Alternativamente, podrían ser usados una serie de estándares de piruvato para calibrar el ensayo. Otros ensayos enzimáticos de naturaleza similar que son comúnmente usados en el laboratorio clínico incluyen la determinación de glucosa, urea, etanol, colesterol, triglicéridos y ácido úrico. Las enzimas son también usadas como indicadores para inmunoensayos.

Almacenamiento de las enzimas

La mayor parte de las enzimas que son utilizadas clínicamente son estables a temperaturas de refrigerador de 2 a 3 días hasta cerca de una semana y a temperatura ambiente por un tiempo más corto. La Tabla 53-3 resume los datos para tres temperaturas.

Varias enzimas merecen un comentario particular. La fosfatasa ácida es inestable a todas las temperaturas a menos que el pH del suero sea reducido cerca de 5 a 6 con citrato o acetato. La fosfatasa alcalina en suero humano muestra un aumento lineal en la actividad dependiendo de la temperatura y el tiempo. En 96 horas (4 días), y a temperatura ambiente, hay un 6% de incremento, a temperaturas refrigeradas aumenta un 4 %, y a -20°C aumenta un 1%. Las enzimas en materiales control no son usualmente de origen humano y son mucho más variadas, siendo algunas más estables y otras menos estables que en el suero humano.

Las vidas medias biológicas observadas de varias enzimas humanas en plasma son dadas en la Tabla 54-4.

Medición Clínica de las Enzimas

Pocas enzimas han sido usadas desde fines del siglo pasado para evaluar enfermedades crónicas, pero no fue sino hasta 1954 que LaDue, Wróblewski, y Karmen encontraron un aumento temporal en la actividad de aspartato aminotransferasa sérica luego de un infarto agudo de miocardio. Después de esto, la medición de cambios en la actividad enzimática plasmática ganó importancia como un medio de seguimiento del curso de una enfermedad o para mejorar el diagnóstico clínico. Muchos investigadores comenzaron a ver cambios en la actividad enzimática que fueron específicos para un estado de la enfermedad o reflejaban daño de un tejido en particular.

Los cambios en la actividad enzimática plasmática o sérica son seguidos, ya que es sabido que las enzimas son principalmente constituyentes intracelulares que son liberados luego que el daño celular ha ocurrido en un órgano o tejido específico. Los cambios que ocurren con muchas enfermedades o en un órgano particular, a menudo pueden ser entendidos



mediante el examen del patrón de varias enzimas o cambios isoenzimáticos durante un período de horas o días.

Enzimas extracelulares versus enzimas celulares

Las enzimas que se encuentran en plasma pueden ser clasificadas dentro de dos grandes grupos. Estas dos subdivisiones mayores están constituidas por las enzimas específicas de plasma y las enzimas no específicas de plasma.

Las enzimas específicas de plasma son aquellas enzimas que tienen una función definida y específica en plasma. El plasma es su sitio normal de acción, y ellas están presentes en concentraciones más altas que en la mayoría de los tejidos. Entre éstas están las enzimas involucradas en la coagulación de la sangre, así como la ferroxidasa, seudocolinesterasa y lipoproteínlipasa. Estas enzimas son sintetizadas en el hígado y son constantemente liberadas al plasma para mantener una concentración constante. Estas enzimas son de interés clínico cuando su concentración disminuye en plasma y algunas han sido históricamente usadas como valoradoras de la función hepática.

Las enzimas no específicas de plasma son aquellas enzimas con función desconocida en plasma. Las enzimas que no son específicas de plasma son aquellas enzimas que no tienen una función conocida en el plasma. Sus concentraciones en plasma usualmente son más bajas que en la mayoría de los tejidos, y puede haber una deficiencia en plasma de los activadores o cofactores que son necesarios para la actividad enzimática máxima. Estas enzimas pueden ser divididas además en: enzimas de secreción, y enzimas del metabolismo intermediario.

Las enzimas de secreción son aquellas enzimas secretadas desde las glándulas exocrinas, esto es, el páncreas y próstata, y algunas enzimas provenientes de la mucosa gástrica y de los huesos. Las enzimas de este grupo son de importancia clínica cuando sus concentraciones son más altas o más bajas que el intervalo de referencia. Se encuentran valores elevados cuando la manera usual de excreción es bloqueada o cuando la cantidad de enzima producida está aumentada. Disminuciones en la cantidad de enzima son encontradas cuando el tejido que ordinariamente produce la enzima está dañado o necrótico. Ejemplos comunes de este grupo son amilasa, lipasa, y las fosfatasas ácida y alcalina.

El otro grupo de importante enzimas no específicas de plasma son las enzimas del metabolismo. Las concentraciones de estas enzimas en los tejidos son muy altas, algunas veces miles de veces más altas que en el plasma. El daño celular que conduce a la pérdida o necrosis deja que una fracción pequeña de estas proteínas escape al plasma y cause un aumento marcado en la concentración usualmente observada. Algunos ejemplos comunes son creatina cinasa (CC), lactato deshidrogenasa (LD), alanina aminotransferasa (ALAT), y aspartato aminotransferasa (ASAT),

Enzimas como marcadores tumorales

Frecuentemente, un exceso de proteínas específicas es liberado al plasma durante el crecimiento celular tumoral. En algunos casos, estas proteínas específicas son enzimas, como la fosfatasa ácida prostática (FAP), o creatina cinasa (CC) y pueden ser convenientemente medidas para monitorear la respuesta a la terapia y estimar la masa tumoral.



Factores que Afectan los Valores de Referencia

Varios factores importantes afectan los valores de referencia para las determinaciones enzimáticas. Si estos factores no son tomados en cuenta en la interpretación de los resultados, es posible hacer un mal diagnóstico. En los siguientes tópicos se da un breve comentario sobre el problema y se muestra un ejemplo.

Tiempo de muestreo

Ya que las enzimas no experimentan ningún ritmo circadiano significativo, el tiempo de muestreo con respecto al momento del día no es importante para la determinación de los valores de referencia para las enzimas. Por otro lado, el momento en el cual se tome la muestra con respecto al inicio de una condición clínica puede ser importante para la detección de una variedad de condiciones crónicas y agudas si los cambios observados son suficientemente rápidos. Los tiempos típicos promedio reportados para la elevación máxima de una serie de enzimas en pacientes con un infarto de miocardio son los siguientes: CC-MB, 6 horas; CC, 18 horas, ASAT, 24 horas; y LD, 48 horas. No todos los pacientes siguen este patrón clásico, y se ha observado un margen de varias horas para los compuestos de interés que cambian rápidamente y de varios días para los compuestos que cambian más lentamente, cuando se examina una variedad de pacientes.

Edad

Hay variaciones en las cantidades de enzimas usualmente presentes en suero, que son el resultado de las diferencias en edad entre varios subgrupos en la población. Hay tres edades principales a considerar como un factor para determinar un intervalo de referencia para un ensayo enzimático. Estas son: durante el primer año de vida, cuando varios órganos, como el hígado, están haciéndose funcionales, durante la pubertad, y en la última mitad de la vida, cuando ocurren cambios hormonales.

Algunos de los cambios más dramáticos son observados con la enzima fosfatasa alcalina. Usando un método de fosfatasa alcalina con amortiguador AMP y sustrato paranitrofenil fosfato a 30° C, se encuentran los siguientes valores: 135 a 270 U/L para niños de 6 meses a 10 años de edad, 90 a 320 U/L para individuos de 10 a 18 años, y 40 a 100 U/L para adultos.

Sexo

Con algunas enzimas se ven diferencias entre los intervalos de referencia para poblaciones masculinas y femeninas. Estas diferencias están probablemente más relacionadas a masa muscular, ejercicio, o concentración de hormonas.

Un ejemplo de estos efectos se ve con la enzima creatina cinasa, donde se han reportado intervalos de referencia más altos para los hombres que para las mujeres, lo cual es más atribuible a un aumento en la masa muscular. La alcohol deshidrogenasa en mucosa gástrica también fue reportada más alta en los hombres que en las mujeres, permitiendo a los



hombres metabolizar el etanol más rápidamente. Por lo tanto, una carga de alcohol no afectará tanto a los hombres como a las mujeres.

Raza

La raza también puede ser un factor en un número limitado de ensayos pero los datos son escasos. Se ha reportado que poblaciones negras tienen intervalos de referencia más altos comparados con poblaciones blancas para creatina cinasa, pero el efecto puede ser un resultado indirecto de varios factores además de la raza en las dos poblaciones.

Ejercicio

El ejercicio y caminar son variables importantes en la consideración de intervalos de referencia para varias enzimas. Se ha encontrado que pacientes que han estado en reposo total por varios días tienen valores de CC en 20-30 % menores que en los pacientes ambulatorios. Cantidades normales de ejercicio también elevarán creatina cinasa. La creatina cinasa adicional causada por ejercicio normal es de tipo MM, tipo CC3. Así, la distinción entre estas elevaciones y aquellas causadas por un infarto agudo de miocardio, en el cual hay aumento de la CC tipo MB o CC₂, se efectúa fácilmente por medio de la determinación del patrón isoenzimático o por medición directa de CC₂. El aumento visto luego del ejercicio, usualmente desaparece después de 12 a 24 horas, a menos que el ejercicio sea muy extenuante. En corredores de maratón, que corren carreras mayores que 42 Km, la CC₂ puede llegar a ser tres veces mayor que el intervalo de referencia y la CC total puede llegar a ser 40 veces mayor que lo usual. Aún cuando se determinen las isoenzimas de CC, puede ser difícil distinguir un corredor con dolor en el pecho de un corredor con dolor en el pecho e infarto de miocardio.

Isoenzimsa

Nomenclatura

Las múltiples formas de una enzima que catalizan la misma reacción en una única especie son conocidas como isoenzimas o isozimas. La Comisión de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica, ha designado que este término sólo se aplica a aquellas formas de enzimas surgidas de diferencias determinadas genéticamente en la estructura de aminoácidos, aunque no hay un acuerdo completo sobre esta designación. Las isoenzimas se distinguen en base a su movilidad electroforética y la primer forma es la que tiene la movilidad más cercana al ánodo (+). Por ejemplo, la CC BB será llamada CC₁; la CC MB como CC₂ y la CC MM como CC₃. Aunque existen en la literatura varios reportes que indican lo contrario, las isoenzimas no pueden ser designadas sobre la base de su distribución tisular (esto es, tipo corazón, tipo cerebro); pues se puede originar confusión como resultado de las diferencias en las formas predominantes encontradas en varias especies.

La IUB ha definido tres grupos de múltiples formas enzimáticas como isoenzimas. Son agrupadas de la siguiente manera: proteínas genéticamente independientes como las formas citosólicas y mitocondriales de CC y malato deshidrogenasa; heteropolímeros de dos o más subunidades distintas como CC y LD; variantes genéticas en la estructura proteica, como



la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa, con más de 50 variedades conocidas en el hombre.

En unos pocos casos no usuales, una subunidad enzimática, como es el caso de la glutamato deshidrogenasa puede tener actividad catalítica por sí misma. En estos casos, la forma natural de la enzima tiene varias subunidades y tiene una actividad mayor que la suma de actividades de las subunidades por separado. Además, la forma de subunidad múltiple de una enzima a menudo tiene activadores e inhibidores que controlan más estrechamente la actividad enzimática. En este caso, existe una estructura biológica más compleja cuya actividad enzimática puede ser regulada más finamente.

Las formas poliméricas de la glutamato deshidrogenasa y fosforilasa no son isoenzimas según la definición de la IUB, ya que son polímeros de una única subunidad y no difieren en la composición aminoacídica. Algunas formas adicionales de enzimas que no encuadran en la definición estricta de isoenzima son aquellas con variaciones en el peso molecular (o longitud). Estas formas pueden originarse por ruptura de diferentes segmentos de una proteína sin que afecten la actividad catalítica, por lo que se producen varias isoenzimas. La hexocinasa y la deshidratasa carbónica son ejemplos de este tipo de isoenzimas.

Isoformas

Las isoenzimas que son liberadas del tejido (CC MM o CC MB) son una forma isoenzimática no modificada. Como parte del proceso de depuración normal del cuerpo, las carboxipeptidasas séricas rompen en la lisina terminal de la subunidad M de la CC y producen otras isoformas de la isoenzima con cargas ligeramente diferentes. La electroforesis de alta resolución o el enfoque isoelectrico pueden usarse para demostrar la presencia de tres isoformas de CC MM y dos de CC MB, que se forman y desaparecen con el tiempo. Las isoformas de CC MM difieren solamente en que ninguna, una, o dos lisinas, han sido removidas de la subunidades CC-M. Las dos isoformas de CC MB son la CC MB intacta y la CC MB, cuya subunidad M ha perdido una lisina. Esto es de interés como posible marcador diagnóstico temprano de infarto agudo de miocardio. Ejemplos de isoformas de CC son dados en la Tabla 54-5. Una descripción más completa de isoenzimas se da en el capítulo 55.

Importancia clínica

Creatina cinasa.

La creatina cinasa (CC) se encuentra principalmente en tejido muscular. Aumentos significativos de CC ocurren en suero cuando el músculo esquelético o el músculo cardíaco han sido dañados. Debido a que la isoenzima principal en músculo esquelético es la CC MM, los mayores aumentos en esta isoenzima en suero ocurren cuando el daño compromete al sistema esquelético (o por accidentes de autos). Por el contrario, hay cantidades significativas de CC MB y CC MM en músculo cardíaco y son liberados cuando el corazón es dañado por anoxia, cirugía, o infarto de miocardio. Se requiere el análisis isoenzimático para diferenciar el tejido fuente del incremento de CC que está presente, luego de la lesión del músculo esquelético o del miocardio. Si la isoenzima CC MM es la isoenzima predominante y la CC MB está presente en menos del 5%, se puede demostrar que un gran aumento de CC es debido al músculo esquelético. Los aumentos de CC MM sérica con una cantidad de CC MB



mayor al 5 %, generalmente ocurren cuando el corazón ha sido dañado.

Existen algunos problemas de interpretación, ya que tanto el músculo esquelético como el tejido miocárdico tienen la isoenzima CC MB. La simple presencia de CC MB en suero no es suficiente para indicar un problema cardíaco. Por ejemplo, ciertas enfermedades musculares incluyendo la distrofia muscular de Duchenne, están asociadas con regeneración muscular, lo cual aumenta la cantidad de CC MB que está usualmente presente en músculo desde menos del 5 % hasta entre 5% y 15 %. El daño muscular producirá entonces un patrón en suero que es consistente con daño miocárdico, y no con daño de músculo esquelético.

A veces la isoenzima CC BB es vista en muestras de pacientes. La presencia de esta isoenzima es más rara que el hallazgo de CC MB.

Lactato deshidrogenasa

La lactato deshidrogenasa (LD) está ampliamente distribuida en muchos tejidos. El corazón, sin embargo, contiene una distribución inusual de las isoenzimas de LD, con una concentración de LD₁ mayor que de LD₂. Este resultado de LD es similar al hallazgo de una distribución inusual de las isoenzimas de CC, en este tejido. La determinación combinada de las isoenzimas de LD y de CC es más útil que cada determinación por separado, ya que estos resultados tienden a sustentarse entre ellos mismos, pero en cierto grado son medidas independientes de daño cardíaco.

Es importante el tiempo de muestreo luego de un evento. Para los eventos clínicos agudos como infartos de miocardio, la toma de varias muestras espaciadas en el tiempo es importante desde el punto de vista diagnóstico. Por este camino se obtiene más información, ya que el patrón de aparición de isoenzimas a varios tiempos en suero es importante. El tiempo promedio para la máxima elevación de una serie de enzimas e isoenzimas en pacientes con un infarto de miocardio se ha reportado como: CC MB, 6-12 horas; CC total 18-24 horas; y LD 48-72 horas. La LD₁ parece ser menor que la LD₂ en muestras tempranas, cuando la CC MB aumenta, pero cuando la concentración de LD total aumenta, tanto LD₁ como LD₂ aumentan en suero. Hay un momento en que el cociente LD₁/LD₂ se invierte y por lo tanto la concentración de LD₁ es mayor que la de LD₂. A medida que aumenta el tiempo después del evento clínico, la concentración de LD₁ eventualmente vuelve a sus valores normales después de varios días, los cuales son menores que los de LD₂. No todos los pacientes siguen el patrón clásico, y se observa un intervalo de dispersión de varias horas para los compuestos analizados que cambian rápidamente y de varios días para aquellos que cambian más lentamente.

Métodos de análisis

Muchos métodos antiguos de análisis aprovechan la ventaja que proporcionan las ligeras diferencias en las propiedades físicas, o en la especificidad de sustrato, o en patrones de inhibición de algunas de las isoenzimas. En la actualidad, estos métodos son raramente usados. Los métodos comunes de análisis aprovechan la ventaja de las diferencias de migración en los campos eléctricos o están basados en diferencias inmunológicas en las subunidades de las isoenzimas. Estos métodos son revisados en el capítulo 55.

El método de referencia para el análisis de las isoenzimas de CC y LD es la

electroforesis. Este método es en cierta medida dependiente de la técnica, pero generalmente es fácil y relativamente poco costoso. También son accesibles una gran variedad de métodos inmunológicos. Estos métodos han ganado popularidad debido a su facilidad de uso y a su sensibilidad. Algunos tienen poca especificidad, y son mucho más costosos que la electroforesis.

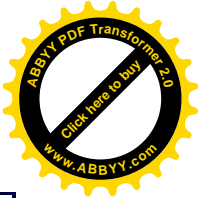
Bibliografía

- Bakerman P, Strausbauch P: *Bakerman's ABC's of interpretative laboratory data*, ed 3, Myrtle beach, S.C., 1994, Interpretative Laboratory Data, Inc.
- Baron DN, Moss DW, Walker PG, Wilkinson JH: Revised list of abbreviations for names of enzymes of diagnostic importance, *J Clin Pathol* 28:592-593, 1975.
- Bowers GN Jr, Inman SR: The gallium melting-point standard: its evaluation for temperature Measurements in the clinical laboratory, *Clin Chem* 23:733-737, 1977.
- Committee on Standards, Expert Panel of Enzymes: Provisional recommendation (1974) of IFCC methods for the measurement of catalytic concentrations of enzymes, *Clin Chem* 22:384-391, 1976.
- Enzyme nomenclature: recommendations on enzyme nomenclature of the Commission on Nomenclature and Classification of the Enzymes of the International Union of Biochemistry*, New York, 1979, Academic Press.
- Hohnadel DC: Clinical enzymology. In Tilton RC, Balows A, Hohnadel DC, Reiss RF: *Clinical laboratory medicine*, St Louis, 1992, Mosby.
- Kaplan LA, Pesce AJ, editors: *Clinical chemistry: theory, analysis, and correlation*, ed 2, St. Louis, 1989, Mosby, Chapters 52 and 53.
- Pappas NJ Jr, editor: Theoretical aspects of enzymes in diagnosis. Why do serum enzymes change in hepatic, myocardial, and other diseases? *Clin Lab Med* 9:595-626, 1989.
- Swaroop A : CK isoenzyme variants in electrophoresis, *Lab Med*, pp 305-310, May 1989.
- Wallach JB: *Interpretation of diagnostic tests*, ed 5, Boston, 1992, Little, Brown & Co.
- Wu AHB: Creatine kinase isoforms in ischemic heart-disease, *Clin Chem* 35: 7-13, 1989.
- Zilva JF, Pannall PR, Mayne PD: *Clinical chemistry in diagnosis and treatment*, ed 5, St. Louis, 1988, Mosby, Chapter 15.

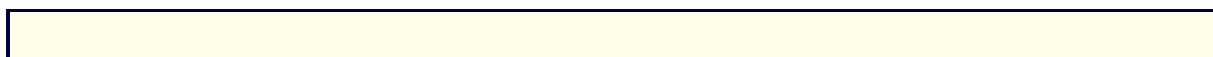
Tablas

Tabla 54-1. Ejemplos de nomenclatura enzimática.

Código EC	Nombre recomendado	Abreviatura*	Nombre sistemático	Otro nombre
Oxidoreductasas				
1.1.1.27	Lactato deshidrogenasa	LD	L-lactato:NAD ⁺ oxidoreductasa	LDH
1.1.1.37	Malato deshidrogenasa	MD	L-malato:NAD ⁺ oxidoreductasa	MDH
1.1.1.42	Isocitrato deshidrogenasa (NADP ⁺)	ICD	treo-D ₅ -isocitrato: NADP ⁺ oxido-reductasa	



			(decarboxilante)	
1.1.1.49	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	GDP	D-glucosa-6-fosfato: NADP ⁺ 1-oxidoreductasa	G-6-PDH, G-6-PDH
1.4.1.2	Glutamato deshidrogenasa	GLD	L-Glutamato:NAD ⁺ oxidoreductasa (deaminate)	–
1.16.3.1	Ferroxidasa	–	Hierro(II): Oxígeno oxidoreductasa	Ceruloplasmina
Transferasas				
2.1.3.3	Ornitina carbamail-transferasa	OCT	Carbamilfosfato: l- ornitina carbamail-transferasa	Ornitina carbamilttransferasa
2.3.2.2	γ-Glutamil-transferasa	GGT	(5-glutamil)-péptido: aminoácido 5-glutamilttransferasa	–
2.6.1.1	Aspartato aminotransferasa	ASAT	L-aspartato:2-oxoglutarato aminotransferasa	Transaminasa glutámico oxalacético sérica SGOT
2.6.1.2	Alanina aminotransferasa	ALAT	L-alanina:2-oxoglutarato amino-transferasa	Transaminasa glutámico pirúvica sérica, SGPT
2.7.1.1	Hexocinasa	HC†	ATP:D-hexosa-6-fosfotransferasa	–
2.7.1.40	Piruvato cinasa	PC	ATP: piruvato 2-O-fosfotransferasa	–
2.7.3.2	Creatina cinasa	CC	ATP:creatina N-fosfotransferasa	CPK
Hidrolasas				
3.1.1.3	Triacilglicerol lipasa	LPS	Triacilglicerol acil hidrolasa	Lipasa
3.1.1.8	Colinesterasa	CHS	Acilcolina acil hidrolasa	Pseudocolinesterasa



3.1.3.1	Fosfatasa alcalina	FAL	Monoéster- ortofosfórico fosfohidrolasa (alcalina óptimo)	—
3.1.3.2	Fosfatasa ácida	FA	Monoéster- ortofosfórico fosfohidrolasa ácido óptimo)	—
3.1.3.5	5'-Nucleotidasa	NT	5'-Ribonucleótido fosfohidrolasa	—
3.2.1.1	α -Amilasa	AMS	1,4- α -D-glucan glucano hidrolasa	Diastasa
3.4.11.1	Aminopeptidasa (citósol)	LAS \ddagger	α -Aminoacil- peptido- hidrolasa (citósol)	Arilamini- dasa (citósol), LAP, Leucina amino- peptidasa
3.4.21.1.	Quimotripsina	—	No (clivaje preferido: Tir, Trp,Phe; Leu)	Quimotrip- sina A y B
3.4.21.4	Tripsina	TPS	No (clivaje preferido: Arg, Lys)	α - y β - tripsina
Liasa				
4.1.2.13	Fructosa bifosfato aldolasa	ALS	D-fructosa- 1,6-bifosfato: D-gliceraldehido- 3-fosfato liasa	Aldolasa
4.2.1.24	Porfobilinógeno sintasa	—	5-aminolevulinato hidrolasa	—
Isomerasas				
5.3.1.1	Triosa fosfato isomerasa	TPI	D-gliceraldehído -3- fosfato: cetoisomerasa	Triosa fosfato mutasa
5.3.1.9	Glucosa fosfato isomerasa	GPI	D-glucosa- 6-fosfato: ceto-isomerasa	Fosfohexo- sa isomerasa

Ligasas



6.3.1.2	Glutamina sintetasa	–	l-glutamato: amonio ligasa (formando ADP)	–
<p>*Baron DN et al: <i>J Clin Pathol</i> 24:656-657,1971 (ref 4) and Baron DN et al: <i>J Clin Pathol</i> 28:592-593, 1975 (ref. 5) <i>no</i> están recomendados por la Unión Internacional de Bioquímica pero son de uso común.</p> <p>†No están listados en las referencias 4 y 5 pero son de uso común en los laboratorios bioquímicos.</p> <p>‡La referencia 5 lista incorrectamente (EC 3.4.11.2) la forma microsomal de esta enzima como "leucina aminopeptidasa"</p>				

Tabla 54-2. Efectos cinéticos de la inhibición

Tipo de inhibición	Cambio en la K_m	Cambio en la V_{max}
Competitiva	Aumenta	No cambia
No competitiva	No cambia	Disminuye
Acompetitiva	Aumenta	Disminuye

Tabla 54-3. Estabilidad de la enzima bajo varias condiciones de almacenamiento (menos de 10% de cambio en la actividad).

Enzima	Temperatura ambiente (cerca de 25° C)	Refrigeración (0° a 4°)	Congelamiento (-25°)
Aldolasa (ALS)	2 días	2 días	Inestable*
Alanina aminotransferasa (SESgo, GPT)	2 días	5 días	Inestable*
α -amilasa(AMS)	1 mes	7 meses	2 meses
Aspartato aminotransferasa (ASAT,GOT)	3 días	1 semana	1 mes
Ferroxidasa I (ceeruloplasmina)	1 día	2 semanas	2semanas
Colinesterasa (CHS)	1 semana	1 semana	1 semana
Creatina cinasa (CC)	1 semana	1 semana	1 mes
γ -Glutamilttransferasa (GGT)	2 días	1 semana	1 mes
Isocitrato deshidrogenasa (ICD)	1 día	2 días	1 día
Lactato deshidrogenasa (LD)	1 semana	1-3 días†	1-3días†
Leucina aminopeptidasa (LAP)	1 semana	1 semana	1 semana
Lipasa (LPS)	1 semana	3 semanas	3 semanas
Fosfatasa, ácida (ACP)	4 horas‡	3 días'	3 días'
Fosfatasa, alcalina (FAL)	2-3 días	2-3 días	1 mes



*Estas enzimas no toleran bien el descongelamiento.
† Dependiendo del patrón de isoenzimas en el suero.
‡ Sin acidificar.
' Con agregado de citrato o acetato para llegar a pH -5.
|| Actividad puede aumentar.

Tabla 54-4. Vida media plasmáticas de enzimas clínicamente importantes.

Enzimas	Vida media (horas) (media ± 2 °C)
LD ₁	53-173
LD ₅	8-12
CC	15
ASAT (GOT)	12-22
SESGO (GPT)	37-57
AMS	3-6
LPS	3-6
FAL	3-7 días
GGT	3-7 días

Tabla 54-5. Isoformas de CC.

Isoforma	Subunidad	Comentario
MM ₃	CC-MM	Isoenzima sin cambio
MM ₂	CC-MM _L	Lisina terminal removida de una subunidad M
MM ₁	CC-M-LM _L	Lisina terminal removida de ambas subunidades
MB ₂	CC-MB	Isoenzima sin cambio
MB ₁	CC-M _L B	Lisina terminal removida de la subunidad M

Las isoformas son numeradas con la misma convención que las isoenzimas, la banda con movilidad electroforética más rápida hacia el ánodo (+), es nombrada como la primera forma.

Figuras

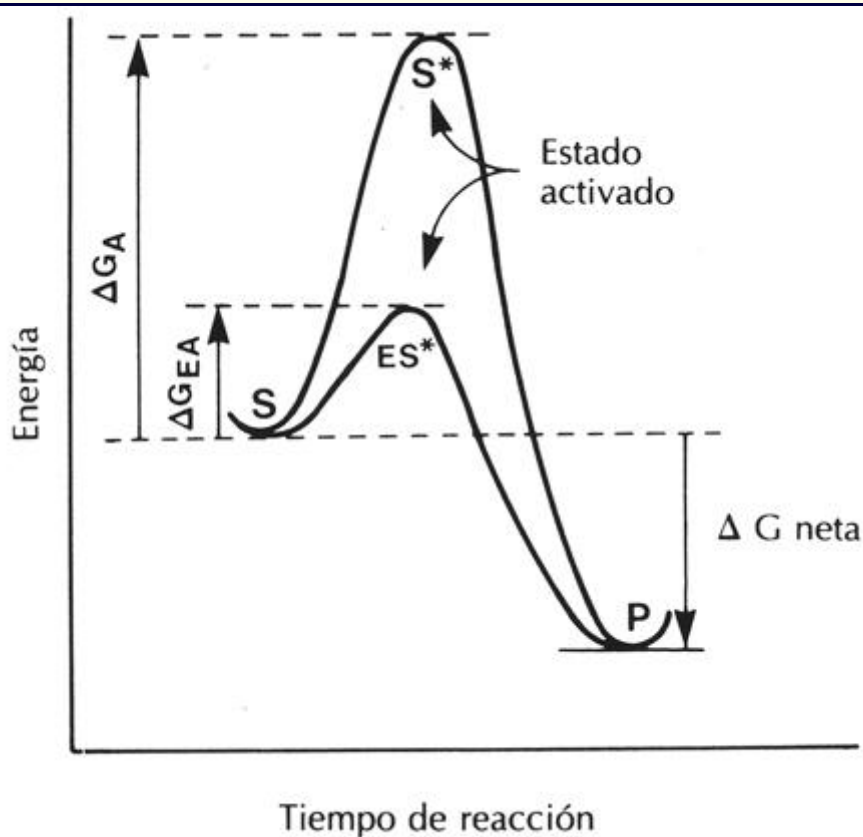


Figura 54-1 Diagrama de energía que muestra la reducción en la energía de activación $\Delta G_{EA} \ll \Delta G_A$ que ocurre para la misma reacción con y sin catalizador enzimático. *A*, estado activado (también *); *EA* activación enzima; *ES*, Enzima sustrato; *G*, energía; *P*, producto; *S*, Sustrato.

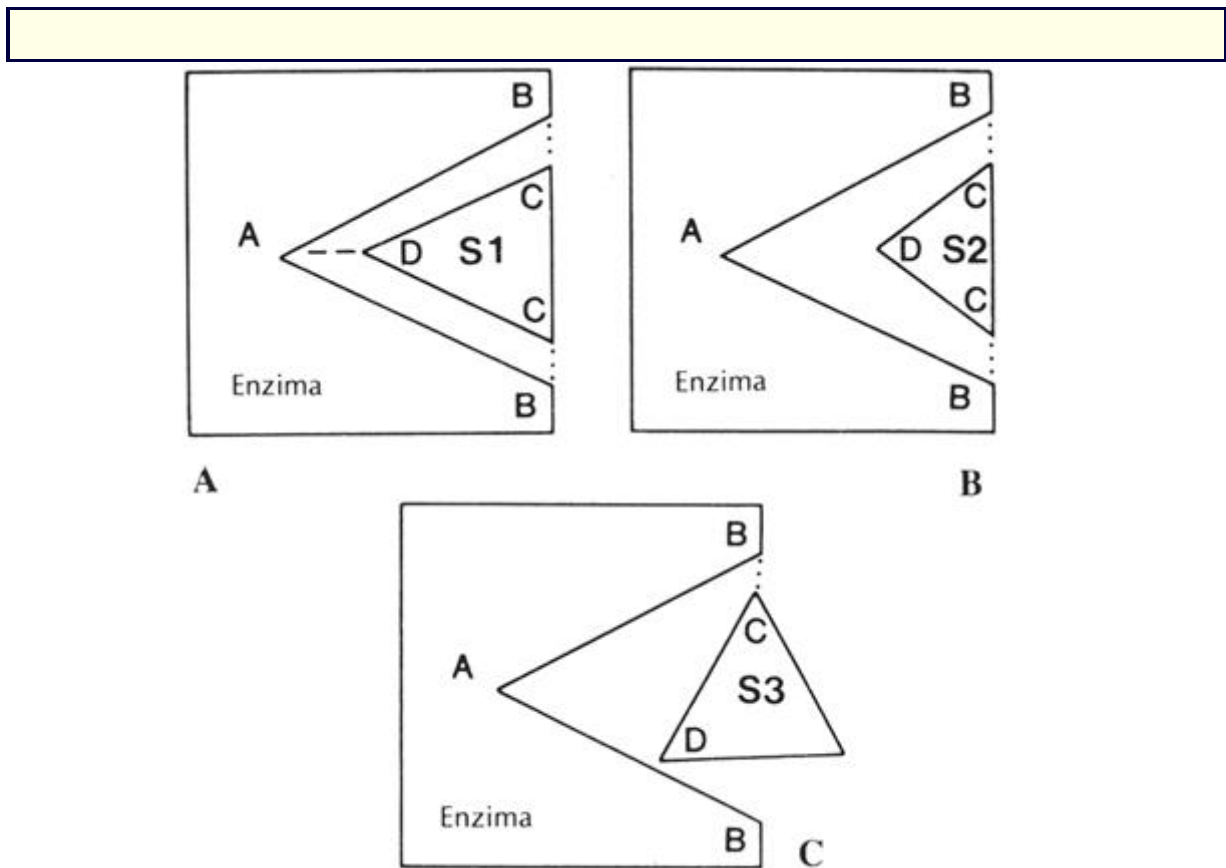


Figura 54-2 El sitio activo en una enzima es el punto A, y los sitios de unión están en el punto B. A, sustrato correcto, S1, tiene sitios de unión complementarios a C, y el sitio activo puede reaccionar en el punto D sobre el sustrato B, el sustrato S2 tiene sitios de unión complementarios, pero el punto D está demasiado lejos para que se lleve a cabo la catálisis. Si S2 estuviera presente junto con S1, podría actuar como un inhibidor dependiendo de las constantes de unión relativas a través de evitar la unión de S1. C, el sustrato S3 tiene sólo un sitio de unión complementario, C, y el punto D no está alineado correctamente para la catálisis.

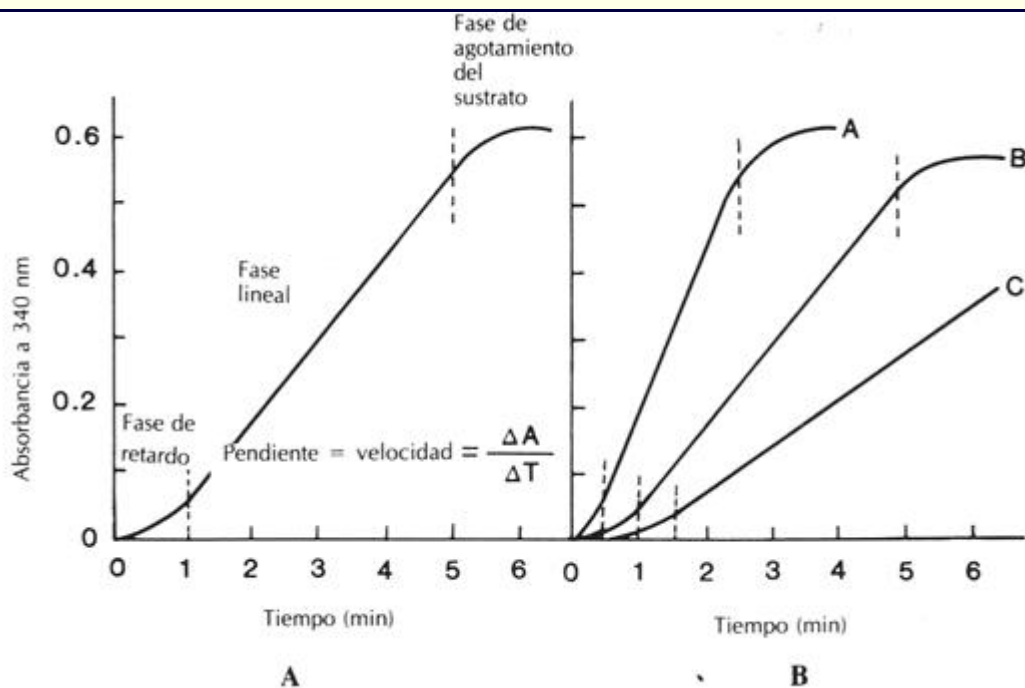


Figura 54-3 A, Típica reacción enzimática con fase inicial lag, cambio lineal de absorbancia, y fase final de agotamiento del sustrato. La actividad enzimática es la pendiente de la fase lineal. B, Desarrollo en el tiempo de una reacción enzimática con tres cantidades diferentes de enzima presente. La curva A tiene una alta actividad, B tiene una actividad media, y C tiene una baja actividad. Cuando la actividad enzimática está aumentada en un ensayo, la fase lag disminuye, la fase lineal disminuye, y el consumo de sustrato ocurre más pronto. ΔA , cambio de absorbancia; ΔT , cambio de tiempo.

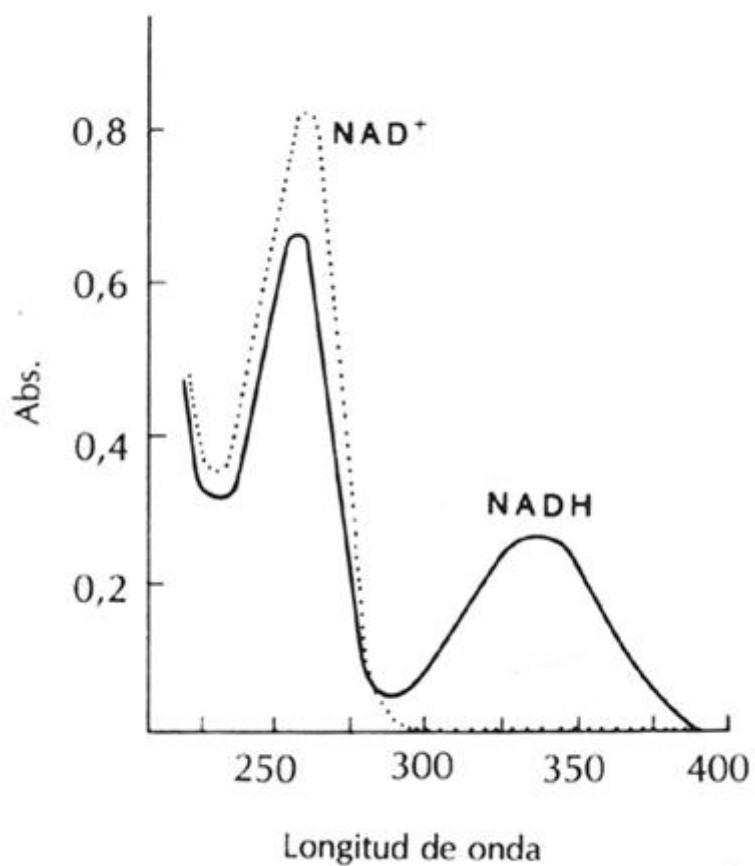


Figura 54-4 Espectros de absorción, Abs., de NAD^+ 5×10^{-5} M en amortiguador de Tris 0.1 M, pH 7.5 (línea punteada), y espectro de absorción de NADH 4×10^{-5} M en amortiguador Tris 0.1 M, pH 9.5 (línea continua).

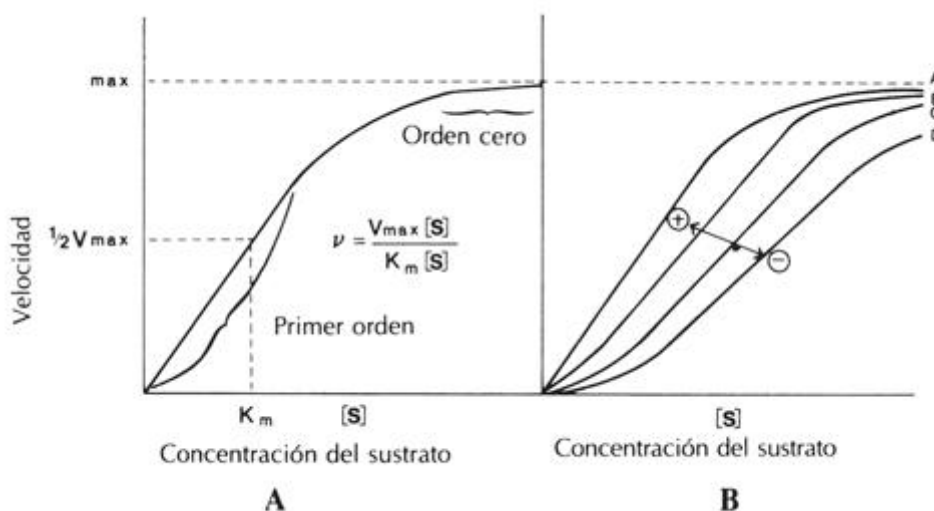


Figura 54-5 A, relación de sustrato ,S, con la velocidad de reacción. A bajas concentraciones de sustrato, la reacción es de primer orden (dependiente linealmente) con respecto a la concentración de sustrato. A altas concentraciones de sustrato, la reacción se hace de orden cero (independiente) con respecto a la concentración de sustrato. K_m , es la constante de Michaelis-Menten; $V_{máx}$, es la velocidad máxima de reacción. B, relación entre velocidad y concentración de sustrato para una enzima alostérica. La presencia de efectores positivos o negativos cambia la curva hacia el lado + o – respectivamente.

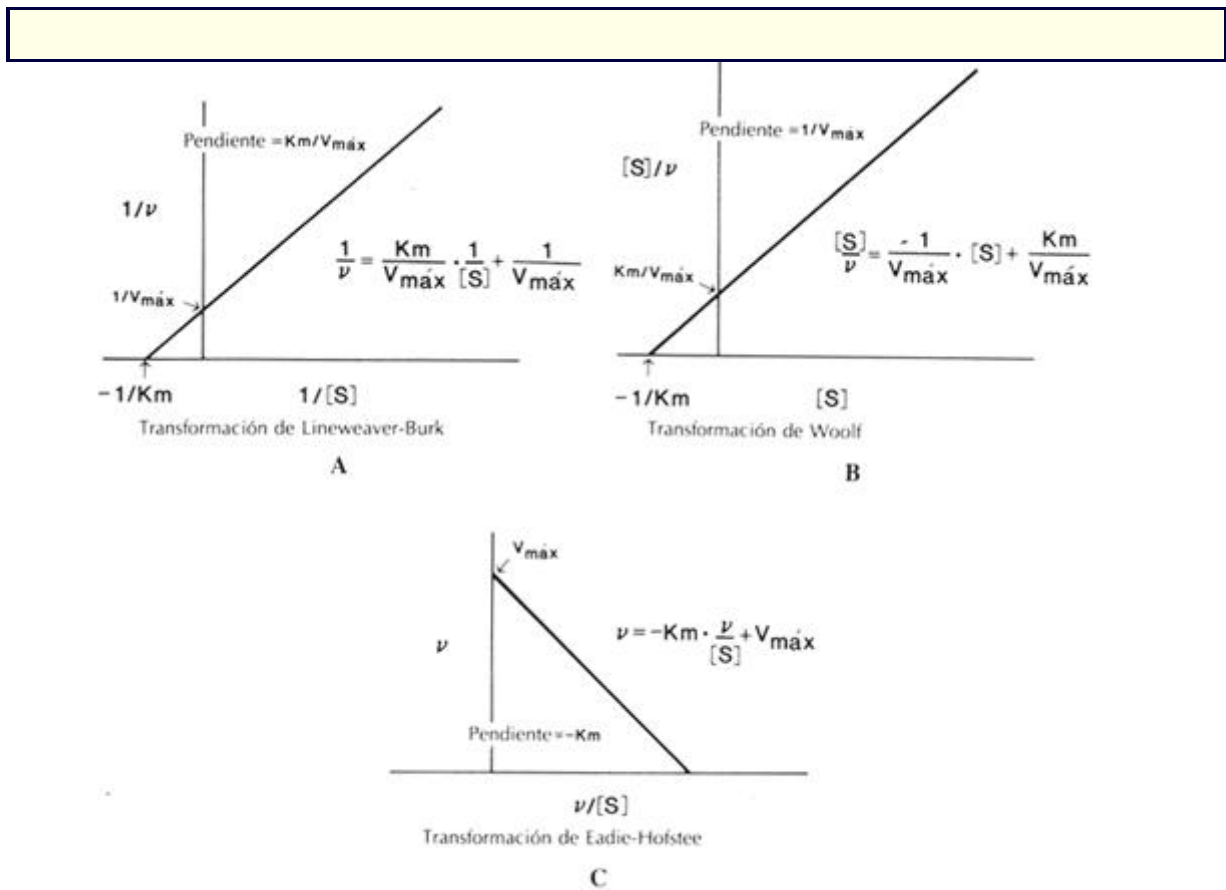


Figura 54-6 Representaciones gráficas de las formas lineales de la ecuación de Michaelis-Menten.

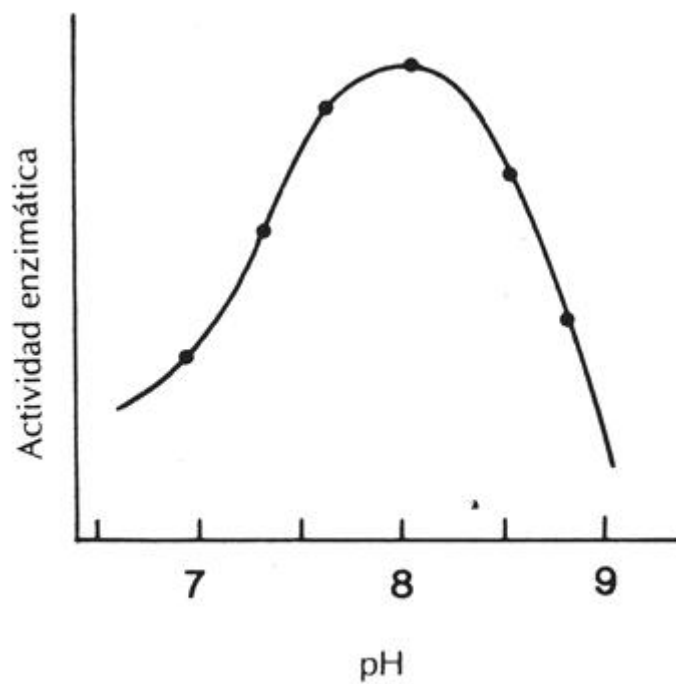


Figura 54-7 La actividad enzimática como una función del pH. El rango de pH óptimo es de 7.8 a 8.2; actividades menores son observadas a pH <7.8 y pH >8.2.

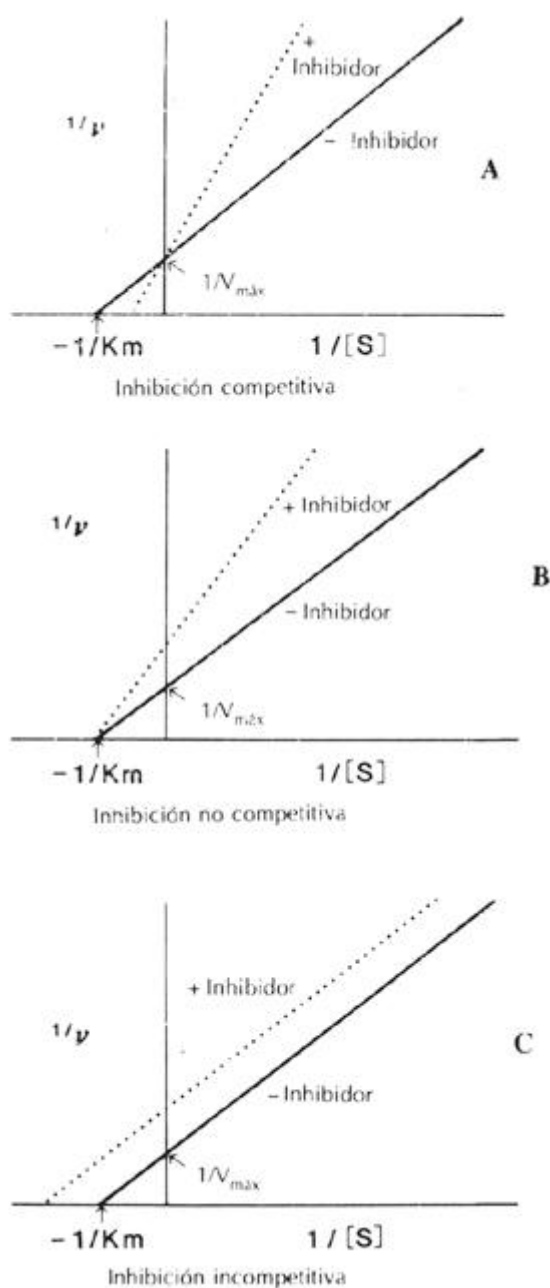


Figura 54-8 Los tres tipos de inhibición se muestran usando el método gráfico de Lineweaver-Burk para demostrar el efecto del tipo de inhibición de K_m y $V_{m\acute{a}x}$.

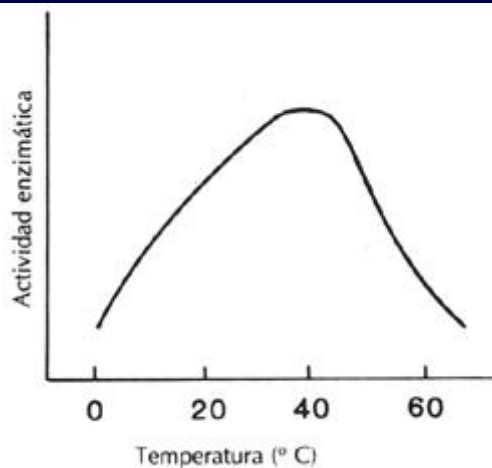


Figura 54-9 La actividad enzimática como una función de la temperatura del ensayo. A bajas temperaturas, la actividad disminuye. Cuando se eleva la temperatura, la actividad aumenta hasta que la velocidad de desnaturalización es mayor que el aumento en la actividad.

CAPÍTULO 55

55. Isoenzimas e Isoformas:

Robert H. Christenson

Kalpana Panigrahi

John F. Chapman

Lawrence M. Silverman

Definiciones

Propiedades de las isoenzimas

Bases estructurales

Origen

Bases genéticas

Modificaciones postraduccionales y resultantes de artefactos

Finalidad o función

Factores microambientales

Factores macroambientales

Factores del desarrollo

Distribución tisular de las isoenzimas principales

Cambio en los patrones isoenzimáticos asociados a los procesos patológicos

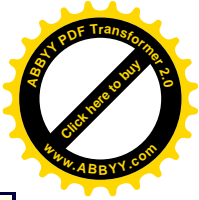
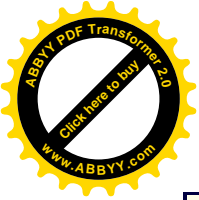
Importancia clínica de isoenzimas específicas

Creatina cinasa

Fosfatasa ácida

Fosfatasa alcalina

Lactato deshidrogenasa



Otras isoenzimas

Fluidos diferentes del suero

Modalidades del análisis de isoenzimas

OBJETIVOS

- Definir las diferencias estructurales de las isoenzimas.
- Describir las bases genéticas de las isoenzimas.
- Analizar el tipo de diferencias entre las enzimas que las hacen isoformas.
- Discutir la finalidad o funciones de las isoenzimas.
- Describir la importancia clínica de la creatina cinasa.
- Enumerar las maneras en que se determinan las isoenzimas.

Términos clave

dímero Una proteína compuesta de dos subunidades.

heteropolímero Un compuesto polimérico, como una isoenzima, que tiene más de un tipo de subunidades.

homopolímero Un compuesto polimérico, como una isoenzima, en el cual todas las subunidades son idénticas.

inmunoinhibición La inhibición de la actividad de la enzima mediante la reacción con un anticuerpo.

isoenzimas Múltiples formas de una enzima que catalizan la misma reacción bioquímica; diferentes isoenzimas pueden existir en diferentes especies, dentro de un organismo o en diferentes organelos celulares. Diversas isoenzimas pueden diferir químicamente, físicamente o inmunológicamente.

isoformas Múltiples formas de las proteínas séricas que son el resultado de las modificaciones postraduccionales del producto génico.

isoenzima Regan Isoenzima específica de la fosfatasa alcalina asociada con algunos cánceres.

macroambiente En el órgano o en el nivel tisular, es un ambiente específico que se asocia con una función fisiológica específica.

microambiente En el nivel celular, es un ambiente o ubicación específica que se asocia con una función fisiológica específica.

modificaciones causadas por artefactos El cambio en la estructura de la proteína causado por la manipulación in vitro.

subunidad Cadena polipeptídica que es una parte integral de una proteína o enzima.

tetrámero Proteína compuesta de cuatro subunidades.

Definiciones

Propiedades de las isoenzimas

Las *isoenzimas*, también denominadas *isozimas*, son formas múltiples de una enzima que catalizan la misma reacción bioquímica y comparten el mismo número asignado por la Comisión de Enzimas (CE). Aunque las isoenzimas de una enzima particular generalmente no

difieren de manera sustancial en el tamaño molecular, cada isoenzima tiene una estructura polipeptídica distinta y puede tener una afinidad diferente por los sustratos y cofactores. Diversas isoenzimas de una enzima pueden diferir en tres maneras principales. Primero, pueden diferir en sus propiedades enzimáticas, específicamente en su capacidad de ser inhibidas por agentes específicos, en sus constantes de Michaelis-Menten (K_m), y en su reactividad con diferentes sustratos. Segundo, pueden diferir en sus propiedades físicas, como la estabilidad térmica y la carga. Último, pueden diferir en sus propiedades bioquímicas, como la composición de aminoácidos y las reactividades inmunológicas.[ref\(2054\)](#)

La mayoría o todas las diferencias anteriores se han usado para la determinación de isoenzimas específicas. Los ensayos basados en estas diferencias se tratan en la página 1084.

Bases estructurales

Las isoenzimas de mayor interés en la química clínica son las proteínas compuestas de dos o más cadenas de polipéptidos o subunidades. Las propiedades globales de una isoenzima dependen del número y del tipo de subunidades polipeptídicas que constituyen la molécula completa. Por ejemplo, considere una isoenzima que es un dímero, o sea, que está compuesta de dos subunidades. Si las subunidades pueden ser ya sea de tipo A o de tipo B, hay tres combinaciones posibles: AA, AB, y BB. Si hay tres subunidades (un trímero), cada una de las cuales puede ser de tipo A o B, entonces hay cuatro isoenzimas posibles: AAA, AAB, ABB y BBB; con cuatro subunidades (un tetrámero), hay cinco combinaciones posibles: AAAA, AAAB, AABB, ABBB y BBBB. Si todas las subunidades son idénticas en la estructura primaria, secundaria y terciaria, como ocurre en AA, BB, AAA, o BBB, la isoenzima se denomina *homopolímero*. Si están presentes diferentes subunidades, como ocurre en AB, AAB, o ABBB, la isoenzima se denomina *heteropolímero*. Este concepto es ilustrado por las isoenzimas dimericas de la creatina cinasa (CC), que se forman de diferentes combinaciones pareadas con dos tipos de subunidades, denominadas *M* (músculo) y *B* (cerebro), la cuales difieren entre sí mismas en la estructura primaria, secundaria y terciaria. Tanto la CC-MM como la CC-BB son homopolímeros; la isoenzima híbrida CC-MB es un heteropolímero.

Origen

Bases genéticas

La existencia de las isoenzimas se estableció en los primeros estudios que usaron la electroforesis y otras técnicas físicas. Muchos avances se han logrado al dilucidar las bases químicas de la diversificación estructural de las isoenzimas; por ejemplo, la digestión trípica y secuenciación de aminoácidos de las cadenas que forman las subunidades condujeron al descubrimiento que las subunidades son a menudo los productos de dos genes relacionados pero separados.[ref\(2055\)](#) Muchas secuencias de aminoácidos dentro de cada cadena de la subunidad son idénticas y a menudo incluyen el sitio enzimáticamente activo; sin embargo, también hay diferencias en la composición de aminoácidos y en las propiedades físicas y antigénicas de diferentes tipos de subunidades. La presencia de estas secuencias de aminoácidos diferentes pero altamente homólogas indica que la diversidad isoenzimática pudo



haber surgido mediante la repetición de genes, seguida de mutaciones independientes de los dos genes, dando lugar a diferentes subunidades. Un ejemplo de esta diversidad es la lactato deshidrogenasa (LD), una enzima tetramérica cuyas subunidades pueden ser del tipo H o del tipo M.[ref\(2056\)](#) La secuencia de aminoácidos de las subunidades de los tipos H y M son similares, incluido el sitio activo. Sin embargo, pequeñas diferencias de las secuencias de aminoácidos entre las subunidades imparten una carga global diferente a las diversas combinaciones de las isoenzimas de LD. La CC citosólica es un dímero compuesto de las combinaciones de las subunidades M y B, cada una de las cuales es codificada por un gen diferente. Estas subunidades se asocian para formar las tres isoenzimas principales de CC: CC-MM, CC-MB, y CC-BB. Un gen mitocondrial codifica para las diferentes CC mitocondriales.

Hay cuatro diferentes genes estructurales conocidos que codifican para múltiples formas de FAL (fosfatasa alcalina).[ref\(2057\)](#) Estos genes han sido clonados, secuenciados y mapeados en los cromosomas humanos. El gen de FAL no específico de tejido (FALIT) está ubicado en el cromosoma 1 y determina la actividad de la enzima FAL expresada en hueso, hígado y riñón. Los tres genes restantes de FAL, que codifican para las FAL intestinal, placentaria, y de células germinales similares al tipo placentario, están muy cercanos entre sí en el cromosoma 2, reflejando el estrecho parecido entre ellas y su diferencia con las de FALIT.[ref\(2058\)](#) La selección evolutiva favorece evidentemente la retención de los genes para diferentes formas de isoenzimas porque transmiten alguna ventaja biológica al organismo (ver adelante, pág. 1079).

Modificaciones postraduccionales y resultantes de artefactos

Los diferentes subtipos o *isoformas*, de las enzimas pueden ser resultado de las modificaciones postraduccionales de la estructura de la enzima parental ya sea mediante la adición de fragmentos químicos o por degradación parcial.[ref\(2059\)](#) Estos cambios pueden producirse intracelularmente, como es el caso de la adición de cadenas laterales de carbohidratos, o después que las proteínas se liberan de las células al plasma, como en los cambios observados con isoenzimas de CC.[refs\(2060\)](#) Aunque el término *isoenzima* a menudo se usa para referirse tanto al producto génico como a las modificaciones postraduccionales, aquí usaremos este término para indicar solamente el producto génico. El término *isoforma* se usará para referirse a las diferencias basadas exclusivamente en las modificaciones postraduccionales.

Las asociaciones entre diferentes unidades monoméricas de una enzima pueden dar lugar a una variedad de propiedades enzimáticas. La oxidación o reducción de grupos funcionales de la molécula de la enzima también puede producir isoformas identificables.[ref\(2061\)](#) Las modificaciones de la cadena proteica, como la adición del ácido siálico, pueden resultar en un gran número de subtipos con diferentes cargas netas y propiedades físicas, y por lo tanto permiten la separación y la identificación de las actividades isoenzimáticas.[ref\(2062\)](#) Por ejemplo, una comparación de las propiedades catalíticas y de termoestabilidad de FAL de hueso, hígado, y riñón indica que estas isoformas son resultado de diferentes modificaciones postraduccionales de un solo producto génico (FALIT, ver anteriormente) común a todas.[ref\(2063\)](#) La evidencia de las modificaciones selectivas de las enzimas por las glucosidasas, indica que las diferencias en las isoformas de FAL pueden ser el resultado de las variaciones en

las cadenas laterales de carbohidratos que se agregan enzimáticamente al producto de génico.[ref\(2064\)](#) Las isoformas de FAL son difíciles de separar por métodos electroforéticos porque las cadenas laterales de carbohidrato no alteran sustancialmente la carga eléctrica global de la enzima. Es posible medir tales isoformas por inmunoensayos, midiendo las diferencias de actividad enzimática en presencia de diferentes sustratos o por la unión de una sustancia de bajo peso molecular, como NAD^+ , la cual influirá en la movilidad electroforética de la enzima.

Las isoformas de algunas enzimas e isoenzimas se forman por degradación del producto génico por la acción de enzimas séricas llamadas *peptidasas*. Esta degradación ocurre después de la liberación del producto génico del compartimento intracelular en el plasma. Un ejemplo clínicamente útil de este proceso se ve con el homopolímero dimérico CC-MM.[refs\(2065\)](#) Después de la liberación de CC-MM intracelular en el plasma, los residuos terminales de lisina de cada subunidad M pueden ser fragmentados sucesivamente por una reacción enzimática irreversible catalizada por una carboxipeptidasa plasmática.[ref\(2066\)](#) Dado que los residuos de lisina imparten una carga positiva, las tres isoformas de CC-MM pueden separarse mediante electroforesis del suero; las tres isoformas se nombran según su movilidad electroforética. CC-MM₃ migra más cercana al cátodo y es la isoforma "tisular" predominante (>95%) dentro del compartimento intracelular; CC-MM₂ muestra una migración intermedia y se forma después que CC-MM₃ se libera de la célula por ruptura de la lisina terminal de una de las dos subunidades M de CC-MM₃; CC-MM₁ migra más cercana al ánodo y resulta de la ruptura de la lisina terminal intacta restante de la subunidad M no modificada de CC-MM₂.[ref\(2067\)](#) Un procesamiento enzimático similar de CC-MB ocurre para permitir la formación de CC-MB₁ de la isoforma tisular CC-MB₂.[ref\(2068\)](#)

Finalidad o Función

Factores microambientales

La importancia funcional de las isoenzimas y las isoformas sigue siendo una pregunta biológica intrigante que se ha sido abordada a través de estudio de células individuales mediante el estudio de la organización de las células en los tejidos y estudiando los procesos de desarrollo del organismo en su totalidad. El hecho de que las isoenzimas e isoformas estén compartimentalizadas dentro de los organelos celulares ha conducido a teorías que proponen una función para estos compuestos en las interacciones subcelulares y en procesos metabólicos específicos. Las diferentes cargas netas de las isoenzimas pueden influir en sus interacciones con otras moléculas cargadas dentro de la célula. Esto puede dar lugar a una ubicación diferencial lógica de isoenzimas específicas con respecto a los organelos especializados de la célula.

Los factores microambientales también son importantes para la FAL. Todas las isoenzimas e isoformas de FAL se adhieren a las membranas celulares por una ancla de glicanfosfatidilinositol con un carboxilo terminal.[ref\(2069\)](#) Aunque se desconoce la función exacta de la FAL (ver ensayo de FAL, pág. 521), basado en la ubicación de la enzima se propone la hipótesis de que la FAL puede desempeñar una función relativamente no específica en varios procesos de transporte en que participan metabolitos defosforilantes, de ese modo



facilitan su entrada celular a través de la membrana celular selectivamente permeable.[ref\(2070\)](#) Además, en virtud de que las isoformas óseas de FAL en la membrana de células de los osteoblastos no son específicas para cualquier tejido, y debido a la asociación de esta FAL con la mineralización ósea, se ha sugerido que FAL funciona para promover la mineralización ósea a través de remover los inhibidores de la cristalización como el fosfato inorgánico.[ref\(2071\)](#) La evidencia en favor de esta teoría ha provenido principalmente de la hipofosfatasa, que se caracteriza por la deficiencia tanto de la enzima como de la mineralización.[ref\(2072\)](#)

Factores macroambientales

También se ha observado la ubicación diferencial de las isoenzimas e isoformas en gran escala, o sea, dentro de diferentes tejidos. Por ejemplo, los tejidos como el corazón, cerebro y corteza renal muestran un predominio de LD₁ y LD₂, mientras que otros tejidos como el músculo esquelético tienen un alto contenido de LD₅. El tetrámero de cadenas H que constituyen LD₁ tiene una afinidad por el piruvato que es diez veces menor que la afinidad de LD₅, un tetrámero de cadenas M. Por lo tanto, LD₁ cataliza preferentemente la conversión del lactato a piruvato. Se ha sugerido que debido a sus propiedades cinéticas la isoenzima LD₁ predomina en los tejidos que reciben un suministro abundante de oxígeno, ya que estos tejidos experimentan metabolismo oxidativo y comúnmente no acumulan el lactato (o piruvato) porque pueden usar el lactato como combustible.[ref\(2073\)](#) La isoenzima LD₅ es la forma principal de LD en el músculo esquelético, la cual es más dependiente de la glucólisis anaeróbica y acumula piruvato en condiciones anaeróbicas. Debido a que las células musculares tienen la isoenzima LD₅, son más capaces de convertir el piruvato en lactato y regenerar NAD⁺, permitiendo que se lleven a cabo las reacciones productoras de energía de la vía Embden-Meyerhof (ver capítulo 32 para detalles adicionales). Por lo tanto se ha propuesto que la distribución de isoenzimas e isoformas en los tejidos se basa en las necesidades y las demandas metabólicas particulares que han evolucionado para diversos tejidos.

Factores del desarrollo

Los cambios del desarrollo en el organismo se reflejan mediante un cambio en la distribución de las isoenzimas e isoformas para muchos tejidos como resultado de la activación y represión génicas diferenciales durante la ontogenia. Estos cambios en la distribución son indicativos de los extraordinarios cambios de la interacción del organismo con su ambiente. Durante el desarrollo fetal, el organismo debe optimizar las reacciones enzimáticas para adaptarse a los notables cambios en el metabolismo aeróbico intracelular. Esto se realiza a través de cambios importantes en la composición de isoenzimas tisulares por la activación de diferentes genes. Este proceso es muy similar al cambio de la forma fetal de la hemoglobina hacia la forma adulta (ver capítulo 36). Aunque las afinidades por oxígeno de la hemoglobina purificada fetal y adulta son muy similares, a concentraciones fisiológicas de 2,3-difosfoglicerato en la sangre, el tipo adulto de hemoglobina tiene menor afinidad por el oxígeno que la que tiene la forma fetal. La mayor afinidad de oxígeno de la hemoglobina fetal

permite una rápida transferencia del oxígeno de la hemoglobina materna a la circulación fetal. Por lo tanto diferentes hemoglobinas, al igual que ciertas isoenzimas e isoformas, satisfacen las diferentes necesidades biológicas del organismo en desarrollo.

La evidencia bioquímica indica que la FAL intestinal fetal puede ser un heterodímero de la FAL placentaria y las subunidades intestinales que se encuentran en el adulto.^{ref(2074)} Este patrón de expresión resulta probablemente porque, durante el desarrollo fetal, el gen placentario y el gen intestinal son coexpresados en enterocitos, dando lugar a la aparición de una isoenzima híbrida de la FAL. La cantidad de esta enzima híbrida se reduce hacia el término del embarazo como resultado de la expresión disminuida del gen placentario. Este patrón es similar al cambio ontológico en la expresión de las subunidades de CC en el músculo esquelético. Durante el inicio del desarrollo fetal sólo el gen de la subunidad B se expresa, permitiendo la formación del dímero CC-BB. Posteriormente, durante la diferenciación, hay un cambio hacia la expresión del gen de la subunidad M, dando lugar primero a la aparición transitoria del heterodímero CC-MB a medida que se expresan tanto la subunidad M como la B y después a la aparición del dímero CC-MM, el cual está presente casi exclusivamente al término de la gestación. Las isoenzimas de LD también muestran diferencias del desarrollo; los tejidos embrionarios no diferenciados muestran máxima actividad para las isoenzimas híbridas LD₂, LD₃ y LD₄.^{ref(2075)} A medida que los tejidos se diferencian, el patrón de LD cambia a fin de adaptarse a los requerimientos de producción de energía para las funciones específicas de los tejidos (ver anteriormente).

Distribución Tisular de las Isoenzimas Principales

Aunque muchas enzimas existen como isoenzimas e isoformas, sólo unas cuantas tienen valor clínico confirmado. Esta sección se enfoca en las isoenzimas e isoformas de CC, LD, FAL y fosfatasa ácida (FA) porque son las principales enzimas de interés clínico.

CC-MM es la isoenzima predominante de CC en el tejido muscular esquelético adulto, con sólo una concentración pequeña de CC-MB, que representa hasta 3% de la actividad total de CC en la mayoría del músculo esquelético. Sin embargo, la proporción de CC-MB puede alcanzar hasta un 10% en algunos tipos de músculos no cardíacos (ver pág. 602). A diferencia del músculo esquelético, el miocardio adulto contiene de 14% a 42% de CC-MB, siendo proporcionada la actividad restante por CC-MM. En el tejido cerebral, la isoenzima de CC que se expresa principalmente es CC-BB (Tabla 55-1).

El corazón es el órgano más rico en la isoenzima LD₁ (H₄), mientras que LD₅ (M₄) se encuentra predominantemente en hígado y en músculo esquelético.^{ref(2076)} Los eritrocitos son ricos también en LD₁. En el pulmón, predominan las isoenzimas LD₂ y la LD₃ (Tabla 55-2).

La forma FALIT de la fosfatasa alcalina (hígado/hueso/riñón) se expresa en prácticamente todos los tejidos. Una actividad alta se observa en particular en la mineralización del hueso donde la FAL está ubicada en la membrana plasmática de las células osteoblásticas. La FAL intestinal se expresa en la mucosa intestinal y es abundante en los bordes de cepillo de las células epiteliales. Recientemente, también se ha observado la expresión de esta enzima en el riñón donde se localiza principalmente en el segmento distal



(S₃) del túbulo proximal.[ref\(2077\)](#) La FAL placentaria se vuelve detectable en el suero de mujeres embarazadas entre la decimosexta y vigésima semana del embarazo y desaparece en un lapso de 3 a 6 días después del parto. También está presente en cantidades relativamente pequeñas en pulmón y en cuello uterino. La FAL de células germinales de tipo placenta se ha encontrado en cantidades muy pequeñas, en el testículo y en el timo de individuos sanos. Al nacer, la FAL en suero parece provenir casi enteramente del hueso, siendo diferente del patrón observado en fetos cuyo suero contiene las formas fetales tanto ósea como la intestinal. El suero de los adultos contiene muchas isoenzimas e isoformas de FAL (Tabla 55-3), aunque las formas principales liberadas en el suero son las de hueso, hígado, riñón e intestinal.[ref\(2078\)](#) No se saben las razones de las diferencias que son características de la expresión de diversas isoenzimas e isoformas en diferentes tejidos y en diferentes células dentro del mismo tejido.

La fosfatasa ácida, FA, es una enzima ubicua, localizada en los lisosomas de todas las células. Los eritrocitos, leucocitos, plaquetas y la glándula prostática tienen concentraciones particularmente altas de FA. Inmunológicamente, las isoenzimas de FA de los tres últimos tejidos enumerados están estrechamente relacionadas. La mayoría de la actividad de FA encontrada en el suero de individuos normales probablemente se deriva de los eritrocitos, mientras que en los hombres sólo una fracción pequeña se deriva de la glándula prostática (ver también pág. 992).

Cambios en el Patrón Isoenzimático Asociado a los Procesos Patológicos

Los cambios en la proporción y concentración relativa de cada isoenzima o isoforma pueden producirse como resultado de una variedad de procesos patológicos. Por ejemplo, la actividad de LD en el tejido aórtico de adulto normal involucra principalmente a la fracción LD₃,[ref\(2079\)](#) sin embargo, en el tejido aórtico aterosclerótico, la actividad máxima de LD está presente como la fracción LD₅. Asimismo, la actividad de LD miocárdica cambia predominantemente de LD₁ a LD₃ durante la evolución de la cardiopatía isquémica.[ref\(2080\)](#) Hay una mayor expresión de la actividad de CC-MB en el tejido miocárdico isquémico comparada con la del miocardio de adulto normal.

Las condiciones patológicas que dan lugar a la regeneración del tejido lesionado pueden causar cambios en la composición de isoenzimas que se asemejan al patrón observado durante el desarrollo embrionario. Por ejemplo, muchas enfermedades musculares, como la distrofia muscular de Duchenne, se caracterizan por la regeneración de fibras musculares que resulta de la destrucción de las fibras musculares adultas. Estas fibras musculares recién formadas e inmaduras pueden contener distribuciones de isoenzimas que son similares a aquellas observadas en el desarrollo temprano. Dado que CC-MB se expresa en el músculo esquelético fetal, esta isoenzima híbrida a menudo se identifica en la sangre de los pacientes con enfermedades musculares, que presentan regeneración muscular esquelética activa.

Debe realizarse con cuidado la interpretación de las isoenzimas y las isoformas porque la isoenzima fetal de un tejido puede representar la forma de la isoenzima adulta de otro tejido. Por ejemplo, la isoenzima de CC-MB representa una proporción significativa de la actividad de CC tanto en el miocardio fetal como en el adulto, mientras que en el feto, CC-MB también



está presente en cantidades grandes en el músculo esquelético. Las cantidades aumentadas de la isoenzima CC-MB en los sueros de adultos normales probablemente representarían daño al corazón, mientras que los incrementos de CC-MB en los niños pueden ser ya sea de corazón o de músculo esquelético. Para una discusión más completa de los problemas interpretativos asociados con la presencia de CC-MB en sueros de pacientes, refiérase al capítulo 31.

La desdiferenciación celular asociada con el desarrollo de neoplasias malignas también puede dar lugar a patrones alterados de las isoenzima e isoformas. Las isoenzimas y las isoformas asociadas con tumores a menudo se denominan *marcadores tumorales oncofetales*, porque su expresión es similar a aquella observada durante el desarrollo embrionario temprano. Por ejemplo, aunque CC-BB es la isoenzima predominante en todo el tejido embrionario temprano, la expresión de esta isoenzima en la mayoría de los tejidos adultos se asocia principalmente con el cerebro y algunos tejidos encontrados en los intestinos (ver Tabla 55-1). En los pacientes sin neoplasia maligna, la detección de CC-BB en el suero a menudo se asocia con una condición patológica que afecta a los sistemas nerviosos, pulmonares o del aparato digestivo.^{ref(2081)} Sin embargo, durante el proceso de desdiferenciación celular, algunas células pueden expresar cantidades significativas de CC-BB, que pueden detectarse en el suero.^{ref(2082)} Las isoenzimas de LD en el suero de los pacientes con neoplasias malignas linfoides son predominantemente la LD₂, LD₃, y la LD₄.^{ref(2083)} Un cambio hacia este patrón en el suero puede indicar la presencia de un mayor número de células linfoides como resultado de una proliferación maligna. Un cambio hacia la expresión de LD₅ se observa en muchos tumores sólidos, especialmente en los carcinomas de los genitales o del aparato digestivo, mientras que en algunos tumores, como los que se originan en las células germinales, hay un cambio hacia la expresión de LD₁.

Se ha encontrado que los tumores humanos producen concentraciones mayores de las isoenzimas e isoformas placentaria (FAL-PL), intestinal (FAL-I), y de células germinales (FAL-CG) de FAL. Aparentemente los procesos malignos activan o amplifican la expresión de un gen de FAL que normalmente está reprimido o expresado a un nivel muy bajo.

En los trastornos del hueso, la producción aumentada de enzimas da lugar a niveles elevados de FAL ósea debido a una mayor actividad osteoblástica. Los niveles séricos aumentados de FAL hepática en las enfermedades hepatobiliares son resultado probablemente de la lesión a los hepatocitos así como de la acumulación de los ácidos biliares como resultado de la colestasis. Una explicación para algunas de las isoformas alternativas de la FAL detectables en suero, especialmente en enfermedades hepatobiliares,^{ref(2084)} es proporcionada por la presencia de la actividad de fosfolipasa D específica de inositol en suero y su aparente ausencia en la bilis. En la enfermedad hepatobiliar, se libera una FAL hidrofílica de los hepatocitos al suero por la acción de la fosfolipasa D sérica. Ya que esta fosfolipasa D está ausente en la bilis, se libera de los hepatocitos un agregado de alto peso molecular de FAL formando un componente denominado fracción rápida de hígado. Esta fracción entra en el suero donde su presencia se considera como una evidencia valiosa de enfermedad obstructiva hepáticas, en particular en la circulación extrahepática.

Importancia Clínica de Isoenzymes Específicas



Para que una enzima, isoenzima o isoforma sea clínicamente útil como un marcador de enfermedad, deben cumplirse varios criterios. Por ejemplo, el marcador debe tener una relación de concentración favorable de tejido con respecto plasma, y debe tener un tiempo de vida sustancial en la sangre. Estos criterios y otros se tratan aún más en el capítulo 54.

Para propósitos prácticos, el suero y el plasma han sido los únicos especímenes clínicos examinados para marcadores de las isoenzimas e isoformas de anormalidades tisulares específicas. El recambio celular normal y las “fugas” características de las células vivas son responsables de las concentraciones basales séricas de las enzimas, isoenzimas, e isoformas en el suero. Estas concentraciones basales definen los intervalos de referencia del laboratorio. Las concentraciones de las enzimas, isoenzimas, e isoformas que están por arriba de estos intervalos de referencia se asocian con una variedad de anormalidades patológicas, que conducen a la destrucción celular y por lo tanto constituyen la base para la utilidad clínica de las determinaciones enzimáticas. El objetivo de la próxima sección es tratar los principales estados de enfermedad asociados con los niveles aumentados de las isoenzimas e isoformas y proporcionar una base para la interpretación de los valores anormales. La determinación de las isoenzimas e isoformas en otros fluidos corporales es poco común y se discute brevemente al concluir esta sección. Aunque se ha mostrado que las isoenzimas e isoformas son una herramienta importante para el diagnóstico de muchas afecciones, se debe desalentar la suposición de que las isoenzimas anormales se asocian solamente con un tejido particular.

Creatina cinasa

Aunque las isoenzimas CC-MM, CC-MB y CC-BB son citoplásmicos, hay actividad de la creatina cinasa (CC) en otros compartimentos subcelulares, en particular en la mitocondria. El peso molecular de CC de 85,000 daltones impide su paso a través de la barrera hematoencefálica excepto en los casos de traumatismo grave; por consiguiente, los aumentos significativos en los niveles de CC sérica reflejan generalmente la liberación proveniente del músculo ya sea esquelético o cardíaco. Mediante la medición de las isoenzimas de CC, generalmente puede discriminarse la liberación del músculo esquelético de la liberación del músculo cardíaco. Al igual que la mayoría de los estudios de laboratorio, las complejidades en la liberación de enzimas y los diversos mecanismos de depuración requieren que la interpretación de las concentraciones sérica de enzimas o isoenzimas se realicen en el contexto de la situación clínica. A menudo, la combinación de múltiples marcadores séricos produce información que hace más práctica la interpretación de las concentraciones enzimáticas.

Anteriormente, era necesario el uso combinado de las isoenzimas de LD y CC para producir la información necesaria que permitiera evaluar a los pacientes admitidos por diagnóstico de infarto miocárdico (IM). Sin embargo, el papel de CC-MB ha ido evolucionando hacia el establecimiento de un estándar para diagnosticar la mayoría de los casos de IM. La LD es un marcador tardío de IM que no está sustancialmente anormal sino hasta 18 a 24 horas después del suceso agudo. El análisis de isoenzimas de LD se vuelve útil cuando las muestras séricas están disponibles únicamente después de que han ocurrido los niveles máximos de la actividad de CC sérica (ver pág. 600).

Existe un problema común de interpretación cuando la lesión muscular esquelética da lugar a una elevación significativa de la actividad de CC en el suero. Debido a que el músculo esquelético contiene concentraciones de CC ocho veces mayores por gramo de tejido húmedo



que las del tejido cardíaco, algunas áreas pequeñas de daño del músculo esquelético o de la enfermedad, pueden dar lugar a concentraciones séricas de CC-MB compatibles con daño sustancial al corazón. En los casos sin complicaciones, el uso del fraccionamiento de isoenzimas generalmente puede diferenciar la fuente de la elevada actividad de CC sérica, porque el músculo esquelético consiste generalmente de más de 97% de la isoenzima CC-MM. El cálculo de un índice relativo, en el cual la concentración de CC-MB es el numerador y CC total es el denominador, puede ayudar a dilucidar la fuente de CC-MB. Para los casos en los que se sospecha de daño tanto cardíaco como muscular, como en los casos de traumatismo o cirugía (ver adelante), la interpretación de los niveles de CC-MB es más difícil (ver adelante y en la pág. 602).

Es importante señalar que una mayor proporción del contenido de CC-MB se asocia frecuentemente con regeneración de la fibra muscular. Por este motivo, ciertas enfermedades del músculo esquelético, como la distrofia muscular de Duchenne o la polimiositis, a menudo dan lugar a elevaciones séricas de CC total y a un aumento anormal de las concentraciones séricas de CC-MB, a menudo de hasta un 5% a un 15% de la actividad total de CC. Dado que la mayoría de los pacientes con estas enfermedades musculares no está siendo evaluado para el infarto miocárdico (IM), la interpretación errónea de estas elevaciones de CC-MB es infrecuente. Sin embargo, esta situación subestima la importancia de obtener información clínica apropiada para la interpretación correcta de los resultados de la isoenzima.

Se pueden encontrar dificultades adicionales en la interpretación de la isoenzimas e isoformas de CC cuando uno está evaluando a los pacientes que se someten a cirugía de tórax o a alguna otra, en particular la cirugía del injerto de la derivación de la arteria coronaria. Puede esperarse que los procedimientos quirúrgicos que involucran el corazón causen la liberación de las enzimas e isoenzimas miocárdicas con concentraciones de isoenzimas que alcanzan niveles compatibles con un IM. En tales pacientes el médico clínico está preocupado frecuentemente por la condición perioperatoria del IM durante la cirugía o durante la recuperación. En estos casos, los resultados isoenzimáticos de CC son sumamente difíciles de interpretar. La experiencia ha llevado a muchos laboratorios a requerir múltiples muestras séricas para el análisis de las isoenzimas de CC durante el período de recuperación (4, 12, 24 y 48 horas, y 3, 5 y 7 días después de la operación). En una recuperación sin complicaciones los niveles de CC-MB regresan a la normalidad en un plazo de 24 horas o se reducen a niveles cercanos al normal. Cuando hay graves complicaciones que incluyen la extensión de la necrosis miocárdica o el reinfarto, los niveles de CC-MB continúan subiendo durante el período de recuperación o aumentan después de una disminución inicial. Existen más marcadores específicos de la lesión miocárdica, como la troponina-I o la troponina-T, que son promisorios para mejorar la capacidad para diagnosticar el IM perioperatorio. [ref\(2085\)](#) Información adicional sobre esta materia se encuentra en el capítulo 31.

Las isoenzimas CC-MB y CC-MM pueden fraccionarse mediante electroforesis de alto voltaje en subtipos o isoformas que difieren en sus puntos isoeléctricos. La formación de isoformas parece desempeñar una función en la depuración normal de las isoenzimas CC-MM y CC-MB de plasma. De las cinco isoformas colectivas de CC-MM y CC MB, solamente MM₃ y MB₂ se encuentran dentro del tejido; cuando son liberadas a la circulación se convierten irreversiblemente en sus isoformas (ver pág. 1079).

Las isoformas de CC-MM se han usado para el diagnóstico precoz del infarto



miocárdico agudo (IM) y para monitorear el éxito de la terapia trombolítica, que puede disolver los coágulos que causa el IM.^{refs(2086)} El patrón de las isoformas de CC-MM puede indicar que tan recientemente ha ocurrido liberación de la enzima del tejido. Poco después de la liberación, la isoforma CC-MM₃ predomina en el suero; posteriormente, después de la ruptura enzimática de ambas lisinas terminales, la isoforma CC-MM₁ es la más prevalente. Un cociente aumentado de las concentraciones MM₃/MM₁ indica una liberación reciente de CC-MM₃ del tejido o su entrada reciente a la circulación sistémica; un cociente menor de las concentraciones MM₃/MM₁ indica, ya sea que la liberación no ha ocurrido o que ha ocurrido mucho antes (ver el capítulo 31 para el detalle).

Ocasionalmente las isoenzimas de CC se usan para evaluar tejidos diferentes al corazón o músculo. Por ejemplo, las concentraciones de CC-BB pueden elevarse en los sueros de pacientes con diversas condiciones, incluida las neoplasias malignas y los desórdenes prostáticos, pulmonares y neurológicos. Sin embargo, debe señalarse que aunque las elevaciones de CC-BB sérica pueden asociarse con estos estados de la enfermedad, los niveles de CC-BB tienen sensibilidad y especificidad deficientes para estas enfermedades, haciendo que tales mediciones sean útiles sólo ocasionalmente.

Fosfatasa ácida

Aunque las isoenzimas de fosfatasa ácida (FA) se encuentran en una variedad de células incluidos los eritrocitos, leucocitos y plaquetas, la isoenzima más frecuentemente medida en el laboratorio clínico es la fracción denotada como fosfatasa ácida prostática (FAP). El método de medición de la FAP afecta a la utilidad clínica de los resultados y se trata en el capítulo 49 en la pág. 992.

Durante casi 40 años se ha visto que la FAP se eleva con frecuencia en los pacientes con estadios avanzados de cáncer prostático. Sin embargo, la FAP rara vez es útil para el diagnóstico de los estadios iniciales del cáncer de próstata porque la sensibilidad clínica de la FAP es baja y las concentraciones de la isoenzima son a menudo normales cuando un paciente tiene cáncer de próstata. Los resultados falsos positivos de la FA se asocian con hipertrofia prostática benigna en donde hay aumento en el crecimiento del tejido prostático no canceroso, que conducen a diversos problemas urológicos. Desafortunadamente, las personas con esta condición son con frecuencia los mismos pacientes que tienen un alto riesgo de cáncer de próstata. Otras elevaciones de falsos positivos se han observado en los pacientes con neoplasias malignas diferentes a las del cáncer prostático como la leucemia, y por consiguiente la interpretación de las concentraciones de isoenzimas depende de una información clínica adecuada. La función diagnóstica de la FAP se ha reemplazado en gran parte por la prueba del antígeno específico de próstata (AEP; ver el capítulo 49). No obstante, los niveles de la FAP todavía se consideran útiles cuando uno está monitoreando a los pacientes que reciben tratamiento para evaluar la carga tumoral, esto es, la cantidad relativa de tejido tumoral que está presente antes del tratamiento o la que permanece después del tratamiento.

Otras situaciones clínicas en las cuales pueden solicitarse estudios de la isoenzima FA incluyen el diagnóstico de la enfermedad de Gaucher, un error congénito del metabolismo así como diversas leucemias en donde se puede medir la fosfatasa ácida (también denominada



fosfatasa alcalina leucocitaria). La FA total y la isoenzima prostática asociada con secreciones prostáticas se han usado en los casos de violación como evidencia legal del asalto sexual.

Fosfatasa alcalina

El valor de la caracterización de las isoenzimas e isoformas de fosfatasa alcalina (FAL) en el suero como una ayuda diagnóstica, ha venido a ser mejor establecida a medida que están disponibles mejores métodos para diferenciar más apropiadamente las diversas formas de FAL. Con mayor frecuencia se solicita el fraccionamiento de FAL para determinar si el hueso o el hígado es la fuente de un nivel elevado de la actividad total de FAL sérica. Las mediciones específicas de las isoenzimas e isoformas de FAL, en comparación con las mediciones totales de FAL, son al menos dos veces más sensibles para la evaluación de enfermedades hepáticas y óseas.

Ha sido probado extensamente que la medición de isoformas hepáticas y del hueso es clínicamente útil para diagnosticar y vigilar ciertas enfermedades de estos tejidos. Se observan altos niveles de la isoforma ósea de FAL en varios trastornos óseos incluidas las enfermedades de Paget, osteosarcoma, hipertiroidismo, y quizás osteoporosis. Además, hay una mayor producción de FAL hepática en las enfermedades hepatobiliares. Las mediciones cuantitativas de la fracción de FAL "ósea" pueden ser importantes para monitorear a los pacientes con enfermedades óseas a fin de evaluar la respuesta del paciente a la terapia.

La expresión aumentada de ciertos genes de FAL, principalmente las variantes de FAL placentaria así como las isoenzimas "Regan" y "Nagao", se asocian con tumores de células germinales. Estas isoenzimas de FAL se expresan predominantemente en los carcinomas hepatocelulares o cuando el hígado es el sitio de un tumor metastásico. Es interesante el hecho de que una cantidad significativa de FAL se expresa en algunas pero no todas las neoplasias malignas. Se desconocen todavía las razones de por las que sólo algunos tumores expresan cantidades significativas de FAL.

Anteriormente, las implicaciones prácticas del análisis de las isoenzimas e isoformas de FAL impedían su medición en muchos casos. Sin embargo, el uso de mejores métodos para medir FAL ósea para el monitoreo de las enfermedades de Paget, osteoporosis, y cáncer óseo puede aumentar el uso futuro del fraccionamiento de FAL.[refs\(2087\)](#)

Lactato Deshidrogenasa

Aunque se han investigado ampliamente las isoenzimas de la lactato deshidrogenasa (LD), la utilidad clínica de estas isoenzimas está limitada principalmente al diagnóstico del infarto miocárdico (ver pág. 596), en parte porque la LD se encuentra en prácticamente todos los tejidos. Aunque hay alguna especificidad tisular relativa para las diversas isoenzimas, hay considerable traslape en la especificidad tisular de la isoenzima con las cinco formas isoenzimáticas comúnmente encontrada en el suero. Por ejemplo, aunque la isoenzima LD₅ se usa con frecuencia para evaluar el daño al músculo esquelético, la LD₅ también es la isoenzima predominante en el hígado. Una situación similar existe para cada una de las otras cuatro isoenzimas, que ha conducido a que la mayoría de los médicos clínicos dependan de otras



pruebas más específicas para la evaluación primaria de hígado, músculo, o corazón. Durante varias décadas se ha observado que hay un aumento de la isoenzima LD₅ en los sueros de pacientes con diversos tipos de cáncer; sin embargo, la asociación de las isoenzimas de LD con tumores es un resultado no específico.

Por lo tanto, el fraccionamiento de isoenzimas de LD es sumamente útil para el diagnóstico tardío del daño miocárdico y lesión muscular, y ocasionalmente para monitorear la evolución de ciertas neoplasias malignas.

Otras isoenzimas

Son dignas de mención las isoenzimas e isoformas de la amilasa, aspartato aminotransferasa y aldolasa porque se ha reportado que tienen algunas aplicaciones clínicas. El fraccionamiento de estas y otras enzimas se realiza por pocos laboratorios ya que la utilidad clínica de estas isoenzimas e isoformas no está bien establecida.

Fluidos corporales diferentes del suero

Algunos informes indican que el fraccionamiento isoenzimático de varias enzimas tiene importancia en el líquido cefalorraquídeo, derrames pleurales, orina y otros fluidos. La finalidad principal de los estudios de las isoenzimas e isoformas en las efusiones, es generalmente poder determinar la fuente del fluido corporal. Estos fluidos se examinan rara vez para la determinación cuantitativa de isoenzimas, y los métodos para el fraccionamiento de las isoenzimas de fluidos son ocasionalmente muy diferentes de aquellos usados para el suero. Dado que existen escasos datos, los laboratorios que participan en el análisis de estos fluidos determinan en general sus propios lineamientos para la consulta e interpretación clínica. Debe ser desalentada la comparación de los resultados con los intervalos de referencia en el suero.

Modalidades del Análisis de Isoenzimas

La mayoría de las diferencias físicas y catalíticas entre las isoenzimas e isoformas individuales han sido utilizadas para determinar las concentraciones de isoenzimas en el suero (Tabla 55-4). Todos estos métodos dependen de las diferencias en las modificaciones postraduccionales de las subunidades polipeptídicas individuales, las cuales imparten variaciones detectables a la molécula de interés. Los métodos más sofisticados que usan inmunoensayos específicos pueden diferenciar entre las isoenzimas y las isoformas basados en las diferencias inmunológicas de las cadenas de la subunidad.

Actualmente es raro el uso de las tasas catalíticas y de afinidad del sustrato para diferenciar entre las isoenzimas de CC. De igual manera, el uso de alfa-hidroxibutirato como un sustrato "específico" para la medición de la actividad de LD₁ se considera ahora un método inadecuado y poco eficaz. Aunque los métodos que usan sustratos específicos para la medición de FA, como el fosfato de alfa-naftilo, todavía se usan para discriminar entre la FAP y otras formas de FA, los métodos que usan L-tartrato para inhibir la actividad de FAP están siendo reemplazados con los inmunoensayos. Los métodos de termoestabilidad, inhibición catalítica, y precipitación de lectina de trigo germinal para la diferenciación de las isoenzimas y



las isoformas con actividad de fosfatasa alcalina, también se usan ocasionalmente para el análisis clínico corriente.

Las técnicas electroforéticas para fraccionar CC han sido consideradas históricamente como los métodos de "referencia" para el análisis de CC-MB. Sin embargo, el uso generalizado de las técnicas de inmunoensayo para la medición de CC-MB que tienen mayor sensibilidad analítica han hecho un anacronismo el uso de la electroforesis como el estándar para la medición de CC-MB. La medición de las isoformas de CC-MM y CC-MB se hace después del fraccionamiento por electroforesis de alto voltaje. Los intentos destinados a desarrollar inmunoensayos para la medición de las diversas isoformas de CC han tenido poco éxito.[refs\(2088\)](#) También se han desarrollado métodos electroforéticos para la separación y cuantificación de la amilasa, FAL, FA, y otras isoenzimas e isoformas. Los métodos electroforéticos separan las formas óseas y hepáticas de FAL en la medida en que la técnica permite un estimado visual de sus proporciones relativas; la cuantificación por barrido densitométrico es posible solamente después del tratamiento con neuraminidasa. Los métodos electroforéticos se basan en las diferencias de la carga neta de cada forma (ver capítulo 10). Los métodos electroforéticos han sido populares porque proporcionan un registro visual de los resultados y son relativamente fáciles de usar.

Los inmunoensayos más recientes se basan en los anticuerpos monoclonales derivados contra sitios específicos de reconocimiento (epítopes) en la molécula de la isoenzima o isoforma. El análisis isoenzimático basado en diferencias inmunológicas entre las isoenzimas y las isoformas se ha convertido en una técnica importante y generalizada. Los métodos de inmunoensayo incluyen técnicas competitivas e inmunométricas de sándwich (ver capítulos 12 y 13) y técnicas de inmunoinhibición. El inmunoensayo y los ensayos inmunométricos de "sandwich" de fase sólida están comercialmente disponibles para la medición de CC-MB, FAL ósea y FAP.

Para mayor información sobre el análisis isoenzimático de las isoenzimas más comúnmente analizadas, refiérase a las tecnologías individuales enumeradas en la Tabla 55-4.

Bibliografía

Foreback CC, Chu JW: Creatine kinase isoenzymes: electrophoretic and quantitative measurements, *CRC Crit Rev Clin Lab Sci* 15:187-230, 1981.
Moss DW: *Isoenzymes*, New York, 1982, Chapman & Hall.

Referencias

1. Wilkinson JH: *Principles and practice of diagnostic enzymology*, London, 1976, EJ Arnold & Son.
2. Moss DW: *Isoenzyme analysis*, London, 1979, The Chemical Society.
3. Markert CL: The molecular basis for isoenzymes, *Ann NY Acad Sci* 151:15-39, 1968.
4. Harris H: The human alkaline phosphatases: what we know and what we don't know, *Clin Chim Acta* 186:133-150, 1989.
5. Moss DW: Perspectives in alkaline phosphatase research, *Clin Chem* 38:2486-2492, 1992.
6. Rothe GM: A survey of the formation and localization of secondary isoenzymes in mammalia, *Hum Genet* 56:129-155, 1980.
7. Panteghini M: Serum isoforms of creatine kinase isoenzymes, *Clin Biochem* 21:211-218, 1988.
8. Wu ABW: Creatine kinase isoforms in ischemic heart disease, *Clin Chem* 35:7-13, 1989.



9. Moss DW: Alkaline phosphatase isoenzymes, *Clin Chem* 28:2007-2016, 1982.
10. Moss DW, Whitaker KB: Modification of alkaline phosphatases by treatment with glycosidases, *Enzyme* 34:212-216, 1985.
11. Perryman MB, Knell JD, Roberts R: Carboxypeptidase-catalyzed hydrolysis of C-terminal lysine: mechanism for in vivo production of multiple forms of creatine kinase in plasma, *Clin Chem* 30:662-664, 1984.
12. Fishman WH: Alkaline phosphatase isoenzymes: recent progress, *Clin Biochem* 23:99-104, 1990.
13. Russell RGG: Excretion of inorganic pyrophosphate in hypophosphatasia, *Lancet* 2:461-464, 1965.
14. Cahn RD, Kaplan NO, Levine L, Zwilling E: Nature and development of lactic dehydrogenases, *Science* 136:962-969, 1962.
15. Behrens CM, Enns CA, Sussman HH: Characterization of human foetal intestinal alkaline phosphatase: comparison with the isoenzymes from the adult intestine and human tumor cell lines, *Biochem J* 211:553-558, 1983.
16. Wilhelm A: Topochemical variation of LDH and CK isoenzyme patterns in aorta, *Artery* 8:362-367, 1980.
17. Pfeleiderer G et al: Tissue enzymes in phylogenetic and ontogenetic development. In Schmidt E et al, editors: *Advances in clinical enzymology*, Hannover, West Germany, 1979, S Karger AG.
18. Verpooten GF, Nouwen EJ, Hoylaerts MF, et al: Segment specific localization of intestinal-type alkaline phosphatase in human kidney, *Kidney Int* 36:617-625, 1989.
19. Bowers GN, McComb RB, Statland BE, et al: Measurement of total alkaline phosphatase activity in human serum (selected method), *Clin Chem* 21:1988-1995, 1975.
20. Lang H, Wurzburg U: Creatine kinase, an enzyme of many forms, *Clin Chem* 28:1439-1447, 1982.
21. Schapira F: Isoenzymes and cancer, *Adv Cancer Res* 18:77-153, 1973.
22. Raymond F, Datta H, Moss D: Alkaline phosphatase isoforms in bile and serum and their generation from cells in vitro, *Biochim Biophys Acta* 1074:217-222, 1991.
23. Adams JE, Sicard GA, Allen BT, et al: Diagnosis of perioperative myocardial infarction with measurement of cardiac troponin I, *N Engl J Med* 330:670-674, 1994.
24. Mair J, Dienstl F, Puschendorf B: Cardiac troponin T in the diagnosis of myocardial injury, *Crit Rev Clin Sci* 29:31-57, 1992.
25. Christenson RH, Ohman EM, Clemmenson P, et al: Characteristics of creatine kinase-MB and the MB isoforms in serum after reperfusion in acute myocardial infarction, *Clin Chem* 35:2179-2185, 1989.
26. Kaddam IM, Iqbal SJ, Holland S, et al: Comparison of serum osteocalcin with total and bone specific alkaline phosphatase and urinary hydroxyproline:creatinine ratio in patients with Paget's disease of bone, *Ann Clin Biochem* 31:327-330, 1994.
27. Garnerio P, Delmas PD: Assessment of serum levels of bone alkaline phosphatase with a new immunoradiometric assay in patients with metabolic bone disease, *J Clin Endocrinol Metab* 77:1046-1053, 1993.
28. Christenson RH: Specificity of an immunochemical reagent for quantifying the isoforms of creatine kinase-MB, *J Clin Lab Anal* 7:220-224, 1993.
29. Panteghini M, Bonora R, Pagani F, Alebardi O: An immunochemical procedure for determination of creatine kinase 3₁ (serum-specific) isoform in human serum evaluated, *Clin Biochem* 23:225-228, 1990.

Tablas

Tabla 55-1 Actividad de la creatina cinasa en diversos tejidos humanos

Tejido	Distribución de isoenzimas en U/g de tejido húmedo (% de actividad total)		
	MM	MB	BB



Músculo esquelético	3281 (100)	0-623 (0-19)	0
Corazón	313 (78)	56-169 (14-42)	0
Cerebro	0	0	157 (100)
Colon	4 (3)	1 (1)	143 (96)
Estómago	4 (3)	2 (2)	114 (95)
Útero	1 (2)	1 (3)	45 (95)
Tiroides	7 (26)	0.3 (1)	21 (73)
Riñón	2 (8)	0	19 (92)
Pulmón	5 (35)	0.1 (1)	9 (64)
Próstata	0.3 (3)	0.4 (4)	9.3 (93)
Bazo	5 (74)	0	2 (26)
Hígado	3.6 (90)	0.2 (6)	0.2 (4)
Páncreas	0.4 (14)	0 (1)	2.6 (85)
Placenta	1.4 (48)	0.2 (6)	1.4 (46)

De: Chapman J, Silverman L: *Bull Lab Med* (National Committee for Mental Health), no 60, pp 1-7, Jan 1982.

Tabla 55-2 Actividad de lactato deshidrogenasa, expresada como porcentaje de la distribución de actividad

Órgano	Distribución de isoenzimas				
	H4	H3M1	H2M2	H1M3	M4
Corazón	60	30	5	3	2
Riñón	28	24	21	11	6
Cerebro	28	32	19	16	5
Hígado	0.2	0.8	1	4	94
Músculo esquelético	3	4	8	9	76
Piel	0	0	4	17	79
Pulmón	10	18	28	23	21
Bazo	5	15	31	31	18

De: Pfeleiderer G et al: In Schmidt E et al, editors: *Advances in clinical enzymology*, Hannover, West Germany, 1979, S Karger AG.

Tabla 55-3 Actividad de la fosfatasa alcalina en los tejidos humanos *

Tejido	Actividad (U/g de tejido húmedo)	
	MAP	DEA
Adrenal	30	66
Placenta	36	—
Hígado	12.6	27



Hueso	7.5	18
Bazo	7.5	18
Pulmón	6.6	15
Intestino	4.8	9
Riñón	4.2	11
Próstata	3.3	6.6
Tiroides	2.1	5.1
Corazón	1.8	3.6
Eritrocitos	0.02	—
Datos calculados de: Bowers GN et al: Clin Chem 21:1988-1995, 1975.		
MAPA, solución amortiguadora de 2-metil-2-amino-1-propanol.		
DEA, solución amortiguadora de dietilamina.		
* La actividad promedio en los dos sistemas amortiguadores de especímenes tisulares de autopsias humanas. Nótese que la diferencia de actividad es del doble entre los sistemas de amortiguadores.		

Tabla 55-4 Modalidades del análisis de isoenzimas (isoformas)

Técnica	Principios del análisis	Isoenzima, isoforma
Electroforesis isoenzimas se separan	Las subunidades tienen diferentes cargas; las isoenzimas son separadas en un campo eléctrico.	Todas
Cromatografía de intercambio iónico	Las subunidades tienen diferentes cargas; las isoenzimas son separadas por afinidad diferencial mediante una resina de intercambio iónico	CC, LD
Inmunoinhibición	El anticuerpo reacciona específicamente con un tipo de subunidad; esta propiedad puede usarse para dejar una isoenzima o isoenzimas catalíticamente inactivas o para eliminar físicamente una isoenzima o isoenzimas de la solución.	CC, LD, fosfatasa ácida
Inmunoensayo	El anticuerpo reacciona específicamente con un tipo de subunidad; el avance de la reacción se monitorea mediante el uso de una marca radioisotópica, enzimática, o fluorescente.	CC, LD, fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina, amilasa
Termoestabilidad	Las subunidades de la isoenzima individual se vuelven catalíticamente inactivas a diferentes temperaturas.	Fosfatasa alcalina



Inhibición catalítica	Las subunidades de la isoenzima individual se unen a inhibidores de bajo peso molecular con diferentes afinidades; tal unión produce una inhibición diferente para cada isoenzima.	Fosfatasa ácida (l-tartrato) Fosfatasa alcalina (urea y l-fenilalanina), colinesterasa (dibucaína)
Especificidad por el sustrato	Cada subunidad de la isoenzima se une a un sustrato con diferente afinidad (Km), dando cada una de las isoenzimas diversas tasas de actividad. También cada subunidad de la isoenzima se puede unir a diversos sustratos con diferente afinidad; diferentes isoenzimas han incrementado las tasas catalíticas con ciertos sustratos, mientras que otras tienen actividades muy bajas.	CC, fosfatasa ácida (fosfato de α -naftilo), LD1
CC, creatina cinasa; LD, lactato. deshidrogenasa		

CAPÍTULO 56

56. Monitoreo de Fármacos Terapéuticos

Wolfgang A. Ritschel

Michael Oellerich

Victor W. Armstrong

PARTE I : REVISIÓN DE PRINCIPIOS BÁSICOS

Destino del fármaco y necesidad del monitoreo de fármacos terapéuticos

Concepto de rango terapéutico

Sistema LADME para describir la disposición de fármacos

Niveles sanguíneos como indicadores de respuesta clínica

Niveles sanguíneos después de una dosis única de fármaco

Efectos de niveles elevados de fármacos

Necesidad de monitorear la terapia con fármacos

Regímenes de dosificación usados para obtener la concentración terapéutica deseada

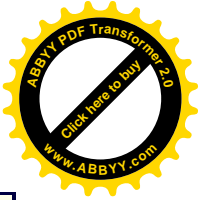
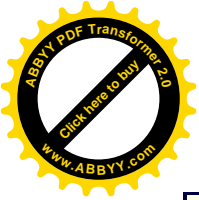
Predicción de dosificación para niveles terapéuticos en estado estacionario

Regímenes de dosis

Farmacocinética

Cinética de primer orden

Cinética de orden cero



Cinética de Michaelis – Menten
Modelos compartimentales
Constante de velocidad de eliminación final
Nivel sanguíneo a tiempo cero
Constante de velocidad de absorción
Vida media de eliminación
Volumen de distribución
Área bajo la curva concentración sanguínea – tiempo
Depuración total
Estado estacionario

Aplicación de conceptos de farmacocinética al MFT

Evaluación clínica
Evaluación por análisis de fármacos
Evaluación por cálculos farmacocinéticos
Análisis farmacocinéticos más complejos

PARTE II : ASPECTOS PRÁCTICOS DEL MFT

Rango terapéutico.

Métodos para predicción de dosis

Ajuste de dosificación en el estado estacionario
Método de tres puntos de Sawchuk
Predicción Bayesiana

Indicaciones clínicas para el MFT

Muestreo y frecuencia del monitoreo de fármacos

Muestreo
Frecuencia del monitoreo de fármacos
Tiempos de respuesta
Análisis de urgencia (tipo stat)

Aseguramiento de calidad

Control de calidad
Aviso de valor crítico
Fármacos que predicen funcionamiento de órganos
Perspectivas futuras

Métodos de análisis

Fármacos anticonvulsivantes
Ciclosporina A
Gentamicina y otros aminoglucósidos
Litio
Teofilina y cafeína

OBJETIVOS

- Describir los pasos involucrados en el proceso fisiológico de un fármaco administrada a un paciente.
- Definir índice terapéutico y rango terapéutico.
- Describir las razones que justifican el monitoreo de fármacos terapéuticos (MFT).
- Describir varios regímenes de dosis y la influencia que tienen en los programas de MFT del laboratorio.
- Enumerar los factores que pueden tener influencia en la necesidad de realizar un análisis de MFT tipo stat.

Términos clave

absorción Paso a la circulación del fármaco no modificado.

biodisponibilidad Cantidad de fármaco en la formulación que puede ser absorbido por el sistema del paciente.

biofase Sitio de interacción entre la molécula del fármaco y su receptor.

cinética de Michaelis – Menten Método de transformación de los niveles plasmáticos del fármaco en una relación lineal, utilizando los parámetros de concentración de fármaco y una constante K_m .

CEM, CIM Concentración efectiva mínima o concentración inhibitoria mínima, para que un fármaco sea activo. Un fármaco es efectivo a cualquier nivel superior a este valor.

C^{ss}_{av} Concentración promedio en el estado estacionario.

$C_{máx}$ Nivel máximo del fármaco en plasma.

$C^{ss}_{máx}$ Concentración máxima en el estado estacionario (concentración pico).

$C^{ss}_{mín}$ Concentración mínima en el estado estacionario (concentración valle).

cinética de orden cero La velocidad de cambio de la concentración plasmática, independiente de la concentración plasmática. Una cantidad constante es eliminada por unidad de tiempo, o sea, $dC/dt = k_0$.

cinética de primer orden La velocidad de cambio de la concentración plasmática de un fármaco que es dependiente de su propia concentración, lo que implica que una proporción constante del fármaco es removida con el tiempo, o sea, $dC/dt = -k \cdot C$.

compartimento Término farmacocinético para la concentración del fármaco, C , y el volumen de distribución de ese fármaco.

concentración pico La más alta concentración alcanzada después de una dosis (por lo general, rápidamente después de la administración de la dosis).

concentración valle La concentración del fármaco más baja alcanzada, generalmente antes de administrar la dosis siguiente.

constante de velocidad de absorción Valor que describe cuánto fármaco es absorbido por unidad de tiempo.

constante de velocidad de eliminación final Eliminación completa del fármaco del organismo por unidad de tiempo.

depuración total (Dp_{tot}) Término que describe cuánto del volumen de distribución de un fármaco es depurado por unidad de tiempo.



distribución División proporcional de fármaco en diferentes compartimentos del organismo, tales como sangre y fluido extracelular.

difusión pasiva Transporte de fármaco a través de una membrana gracias a un gradiente de concentración.

dosis de mantenimiento Cantidad de fármaco requerida para mantener la concentración media deseada en el estado estacionario.

efecto farmacológico Influencia de un fármaco en el estado bioquímico o fisiológico de un paciente (por ejemplo, disminución de la presión arterial y bacteriostasis)

eliminación Excreción final de un agente.

estado estacionario Condición en la cual son equivalentes la entrada del fármaco y su salida. Se obtiene cuando, después de múltiples dosis, la concentración pico y la concentración valle oscilan dentro de cierto rango después de cada dosis

fármaco libre Agente farmacológico presente en fluidos biológicos sin unirse a otras moléculas.

fármaco unido Agente farmacológico que existe en la sangre, formando un complejo con otra molécula (generalmente con una proteína o con un lípido).

farmacocinética Estudio cuantitativo de la disponibilidad del fármaco en el organismo.

índice terapéutico Relación entre las concentraciones plasmáticas que producen los efectos deseados y los efectos no deseados de un fármaco.

LADME Acrónimo para la distribución de un fármaco en función del tiempo: **L**iberación, **A**bsorción, **D**istribución, **M**etabolismo y **E**liminación.

liberación Proceso por el cual el fármaco se libera de su forma de dosificación.

liberación lenta Forma de dosificación del fármaco que le permite disolverse lentamente.

metabolismo Biotransformación del fármaco padre en sus metabolitos.

método de dosificación de fluctuación limitada Método de dosificación en el que la cantidad de fármaco administrada no debe exceder ni estar por debajo de límites especificados.

Método de dosificación pico Método mediante el cual el fármaco, para ser efectivo, debe alcanzar un nivel máximo específico.

nivel sanguíneo a tiempo cero Hipotética concentración sanguínea obtenida por extrapolación a tiempo inicial o tiempo cero de administración. Generalmente da por resultado un valor máximo.

prodroga Compuesto madre que generalmente no es activo y que debe ser metabolizado a la forma activa.

rango terapéutico Relación entre el efecto clínico deseado de un fármaco y su concentración plasmática.

receptor Estructura en el organismo con la cual interactúa el fármaco, produciendo su efecto farmacológico. Está frecuentemente localizado en una membrana celular o en otro componente celular.

subterapéutico Nivel de fármaco menor que el necesario para obtener el efecto clínico deseado.

t Intervalo de dosis.

t_{máx} Tiempo de concentración máxima del fármaco.

tóxico Término que implica los efectos colaterales adversos o deletéreos, a veces fatales, de un agente terapéutico que está presente en un nivel demasiado alto.



transporte activo Movimiento de un fármaco a través de una membrana, que involucra su unión a una molécula transportadora y su paso al lado opuesto de la membrana, con gasto de energía.

ventana terapéutica Término que describe la curva, con forma de campana, del nivel del fármaco *versus* la respuesta farmacológica.

vida media ($t_{1/2}$) Cantidad de tiempo requerida para reducir el nivel de un fármaco a la mitad de su valor inicial. Generalmente, se refiere al tiempo necesario para reducir el valor plasmático a la mitad de su valor inicial. El término también se aplica a la desaparición de la cantidad total del fármaco del organismo.

PARTE I: REPASO DE PRINCIPIOS BÁSICOS

Wolfgang A. Ritschel

Disposición del Fármaco y Necesidad del Monitoreo de Fármacos Terapéuticos

Concepto de rango terapéutico

Se ha establecido para muchos fármacos una relación entre su concentración en plasma y los efectos clínicos. En general, para lograr el efecto farmacológico deseado que provoque el efecto clínico (por ejemplo, disminución de la presión sanguínea, alivio del dolor, o bacteriostasis), se debe alcanzar una determinada concentración en el sitio de interacción entre la molécula del fármaco y el receptor (membrana celular, componente celular).

Normalmente, las únicas mediciones disponibles para evaluar las interacciones de los fármacos a nivel celular son las mediciones de los niveles del fármaco en suero. Si se representa gráficamente el grado de respuesta clínica a un fármaco *versus* el logaritmo de la dosis o la concentración sanguínea del fármaco, se obtiene una curva lineal. La misma curva semilogarítmica se obtiene si se representa gráficamente la dosis del fármaco o la concentración sanguínea *versus* el porcentaje de una determinada población que tiene una respuesta clínica específica al fármaco. Se considera subterapéutica a cualquier dosis o concentración que no provoque un efecto cuantificable. Cualquier dosis o concentración mayor que la dosis o concentración mínima para alcanzar 100 % de efectividad no es garantía, y puede ser tóxica (ver siguiente cuadro).

Principales causas que provocan concentraciones no esperadas del fármaco en suero, fuera del rango terapéutico

No cumplimiento por parte del paciente

Dosificación inapropiada

Mala absorción

Pobre biodisponibilidad de la preparación administrada



Interacciones entre fármacos
Enfermedad renal y/o hepática
Unión alterada a proteínas
Fiebre
Metabolismo lento o rápido, genéticamente determinado

Similar a la curva de logaritmo de la dosis *versus* respuesta clínica, también existe generalmente una curva similar de logaritmo de la dosis *versus* toxicidad (ver capítulo 51). Se encuentra frecuentemente una superposición entre la porción superior de la *curva D-R* y la porción inferior de la *curva D-T*. Para la mayoría de los fármacos, el rango terapéutico es un rango de concentraciones ubicado entre el tercio inferior y la porción media de la curva log de concentración *versus* respuesta.

La pendiente de esta curva indica la magnitud del rango terapéutico. La toxicidad absoluta es menos importante que la relación entre la dosis tóxica promedio y la dosis terapéutica promedio o concentración promedio (ver más adelante). Esta relación, llamada *índice terapéutico*, es estrecha para algunos fármacos (digoxina, litio) y amplia para otras. Por lo tanto, el rango terapéutico también puede ser estrecho o amplio. Es particularmente deseable monitorear las concentraciones de aquellos fármacos que tienen un rango terapéutico estrecho y un índice terapéutico bajo (digoxina, litio, gentamicina), que presenten una cinética de eliminación dependiente de la dosis (fenitoína), o que exhiban grandes variaciones individuales en su metabolismo (antidepresivos tricíclicos). En estos casos, es importante para el médico saber si el fármaco está presente en una concentración dentro del rango terapéutico.

El objetivo de este capítulo es describir el destino del fármaco una vez administrada, comentar los regímenes de dosis utilizados para alcanzar el rango terapéutico, y describir algunos principios farmacocinéticos básicos.

Sistema LADME para describir el destino de un fármaco en el organismo

Es generalmente aceptado que los cambios en la concentración de un fármaco en el organismo, que ocurren con el tiempo, están relacionados al curso de los efectos farmacológicos. Estos cambios de la concentración del fármaco con el tiempo están descritos por el sistema LADME, en el cual se consideran en forma secuencial la *Liberación*, *Absorción*, *Distribución*, *Metabolismo*, y *Eliminación* del fármaco.

Liberación del fármaco a partir de su forma de dosificación

Para ser absorbida, un fármaco debe estar presente en forma de solución verdadera en el sitio de absorción. Por ello, el ingrediente activo de cualquier forma de dosificación debe ser liberado de ella para permitir su absorción, excepto de aquellas que ya constituyen soluciones verdaderas (por ejemplo, inyecciones intravenosas, elixires o jarabes perorales, enemas rectales, gotas oculares y nasales). La liberación es un proceso mediante el cual el fármaco pasa a una solución: (a) Cuando es administrada en forma oral (tabletas, cápsulas, pastillas o suspensiones), el fármaco se disuelve en el fluido gástrico. (b) Después de una inyección



intramuscular o subcutánea de una suspensión, el fármaco se disuelve en el fluido tisular. (c) Luego de una administración rectal, los supositorios se derriten en el recto, y el fármaco se disuelve en el fluido rectal. (d) Después de la aplicación de ungüentos, el fármaco se disuelve en el agua de transpiración presente en la interfase entre la piel y el ungüento. Estos son algunos de los casos que requieren la liberación del fármaco para que éste sea absorbido.

Para aquellas sustancias que no permanecen demasiado tiempo en el organismo, se han desarrollado formas de dosificación de liberación controlada o prolongada, que son preparaciones que presentan una lenta velocidad de liberación. Dado que el fármaco no puede ser absorbido a una velocidad mayor que su velocidad de liberación, la velocidad de absorción aparente se transforma en una función de la velocidad de liberación, y todo el proceso de absorción lleva más tiempo, provocando una duración prolongada del efecto clínico.

Absorción

Es el proceso mediante el cual la molécula del fármaco pasa a la circulación sistémica, generalmente denominada torrente sanguíneo. El proceso de absorción debe ocurrir siempre y cuando un fármaco sea administrado *extravascularmente*, es decir, en forma peroral, oral, intramuscular, subcutánea, rectal, tópica y otras.

Cuando el fármaco se administra *intravascularmente*, en forma intravenosa, intra-arterial o intracardiaca, no hay absorción debido a que el fármaco es introducido directamente en el torrente sanguíneo.

Existen varios mecanismos de absorción: difusión pasiva, transporte activo, transporte facilitado, transporte convectivo y pinocitosis. La difusión pasiva se aplica al 95 % de todas los fármacos. Depende de que la concentración del fármaco no ionizado sea mayor en un lado de la membrana que en el otro. Siempre y cuando exista un gradiente de concentración a través de la membrana, el fármaco será absorbido hacia la zona de menor concentración. Para electrolitos débiles, el pKa del fármaco y el pH en el sitio de absorción (estómago pH 1,5 a 3; intestinos pH 5 a 7; recto pH 7,8; o piel pH 5) influyen en el grado de ionización. El pH de la sangre es 7,4 y es relativamente constante. Como regla general, las especies ionizadas del fármaco son absorbidas en forma pasiva menos fácilmente que las especies no ionizadas. A dos unidades de pH por debajo del pKa de un fármaco ácido, y a dos unidades de pH por encima del pKa de un fármaco básico, los compuestos estarán 99 % no ionizados y tendrán velocidades de absorción máximas.

El *transporte activo* requiere la unión de la molécula del fármaco a un transportador (proteína) de la membrana, que deposita al fármaco en el lado opuesto de la membrana mediante un gasto de energía. Este proceso moviliza al fármaco (por ejemplo, glucósidos cardíacos, hexosas, monosacáridos, aminoácidos, riboflavina) en contra de un gradiente de concentración. El *transporte facilitado* es un mecanismo similar al anterior, pero el movimiento de la sustancia está facilitado porque tiene la misma dirección que el gradiente de concentración (ejemplo, vitamina B₁₂). El *transporte convectivo*: mecanismo de absorción por el cual pequeñas moléculas (como la urea), pasan a la circulación sistémica a través de poros llenos de agua presentes en la membrana.

Para todos los mecanismos mencionados anteriormente, el fármaco debe estar presente en el sitio de absorción en una solución acuosa verdadera.

Un mecanismo distinto y único es la *pinocitosis* de las grasas y de las partículas



sólidas. Se forman vesículas atrapantes en la membrana celular, que se abren hacia el lado intracelular, y liberan las gotas de lípidos o partículas. Ejemplo: vitaminas A, K , D y E, huevos de parásitos, grasa y almidón.

Distribución

Una vez que las moléculas del fármaco son absorbidas y pasan al torrente sanguíneo, pueden : (1) permanecer en el mismo, (2) abandonarlo y pasar a otros fluidos extravasculares, como el fluido intersticial, o (3) migrar hacia varios tejidos y órganos. El proceso completo de transferencia del fármaco desde el torrente sanguíneo hacia otros compartimentos se denomina *distribución*. Generalmente, dura entre 30 minutos y dos horas, pero también puede completarse en pocos minutos, o tomar mucho más de dos horas (por ejemplo, el tiempo de distribución del methotrexate es 15 horas).

Metabolismo

Es el proceso de biotransformación de la molécula del fármaco padre en uno o más metabolitos. Estos son generalmente más polares, es decir, más hidrosolubles, y por lo tanto, pueden ser más fácilmente excretados por el riñón. El metabolismo se realiza fundamentalmente en hígado y riñón, aunque también se lleva a cabo en plasma y tejido muscular. Generalmente, aunque no siempre, los metabolitos son menos activos y menos tóxicos que los correspondientes compuestos que les dieron origen. Sin embargo, debe mencionarse un grupo de drogas, denominadas *prodrogas*, que son compuestos madre generalmente no activos, que deben ser metabolizados a su forma activa. Por ejemplo, el compuesto anticancerígeno ciclofosfamida es inactiva, y debe ser biotransformada al compuesto activo 4-hidroxi-ciclofosfamida. La forma activa de las prodrogas es inestable, o no es fácilmente soluble, o bien es pobremente absorbida.

Algunas drogas forman metabolitos que también son activos. Por ejemplo, el fármaco activo procainamida es biotransformado en un metabolito igualmente potente, la acetilprocainamida. El conocimiento de los metabolitos activos es de particular importancia en la monitoreo de fármacos terapéuticos para correlacionar la concentración total de todas las formas activas con los efectos farmacológicos.

Eliminación

Es el proceso de excreción final del fármaco del organismo, ya sea como compuesto padre no modificado o en la forma de sus metabolitos correspondientes. Las principales vías de excreción son los riñones a través de la orina, y el hígado a través de la bilis, y consecuentemente de las heces. Otras vías de eliminación son: piel (sudor), pulmones (aire espirado), glándulas mamarias (leche) y glándulas salivales (saliva).

La vida media de eliminación es el tiempo requerido, una vez alcanzado el equilibrio, para reducir la concentración sanguínea a la mitad. Después que el fármaco es absorbido y distribuido, se requiere una (1) vida media para eliminar el 50 % del fármaco, siete (7) vidas medias para eliminar el 99 %, y diez (10) vidas medias para eliminar el 99,9 % del fármaco.

Efecto de la variación biológica en LADME

Si un fármaco es administrado en cantidades iguales a gemelos univitelinos, por la misma vía de administración, y a la misma hora del día, los parámetros farmacocinéticos



diferirán sólo muy ligeramente. Las diferencias serán mayores si los gemelos son bivitelinos. Las diferencias serán aún mayores dentro de un grupo poblacional, aún si este grupo es homogéneo en cuanto a edad, sexo, peso corporal y estado de salud. Estas diferencias expresan variaciones de origen genético en el manejo del fármaco, que pueden influenciar su absorción, distribución, metabolismo, eliminación, e interacciones fármaco-receptor. Por lo tanto, los parámetros farmacocinéticos para individuos sanos que se encuentran en bibliografía son valores promedios con sus rangos, que realmente son válidos únicamente para el grupo estudiado.

Factores fisiológicos y patológicos que afectan el destino del fármaco

Además de las variaciones biológicas causadas por diferencias genéticas, existen muchos factores fisiológicos y patológicos que pueden alterar considerablemente la disposición del fármaco.[ref\(2089\)](#)

Los factores fisiológicos más importantes incluyen peso y composición corporal, edad, temperatura (hipertermia e hipotermia), tiempo de vaciado gástrico y motilidad intestinal, flujo sanguíneo (en reposo y en ejercicio), condiciones del medio ambiente (por ejemplo, altitud o mal de montaña), nutrición, embarazo y ritmo circadiano.

Entre los factores patológicos más importantes se pueden mencionar: disfunción renal, disfunción hepática, insuficiencia cardíaca congestiva aguda, quemaduras, shock, trauma, y enfermedades gastrointestinales.

Niveles sanguíneos como indicadores de la respuesta clínica

El fundamento para la utilización de los niveles sanguíneos como indicadores de respuesta clínica está basado en el concepto que para aquellos fármacos que interactúan con el receptor sin sufrir cambios, su concentración en el sitio de acción determinará la duración e intensidad del efecto farmacológico. Dado que es imposible tomar una muestra en el mismo sitio de acción o biofase (por ejemplo, la membrana celular), la mejor alternativa es emplear sangre entera, plasma, o suero, que son fluidos biológicos en equilibrio con el receptor, y son fáciles de obtener. Después que finaliza la fase de distribución, las concentraciones del fármaco en los compartimentos central y periférico (es decir, en la sangre) disminuirán en forma paralela. En ese momento, se obtiene un pseudoequilibrio de distribución, independientemente del compartimento en que se encuentre el sitio de acción. Aunque la concentración del fármaco total puede diferir considerablemente entre los compartimentos centrales y periféricos, la concentración del fármaco *libre* (no unida) será la misma. Por lo tanto, una vez alcanzado el mencionado pseudoequilibrio de distribución, existirá una correlación entre el efecto farmacológico y la concentración del fármaco en sangre. Generalmente, se mide solamente la concentración del fármaco total en plasma, lo cual es bastante aceptable en condiciones normales, porque las diferencias individuales son pequeñas respecto a la unión a proteínas plasmáticas.[ref\(2090\)](#) Sin embargo, en algunos casos esto no es cierto.[refs\(2091\)](#)

Niveles sanguíneos después de una dosis única del fármaco

La respuesta farmacocinética se visualiza a través del gráfico de la concentración sanguínea en función del tiempo (Fig. 56-1). La forma de la curva depende de la vía de



administración y del sistema LADME.

Después de una administración intravenosa rápida, todo el fármaco se encuentra instantáneamente en la circulación sistémica. Si es administrado por vía extravascular, nada habrá en la circulación sistémica en el momento de la administración, es decir, a tiempo cero. La curva nivel sanguíneo - tiempo aumenta debido a la continua absorción, después de producirse la liberación del fármaco de su forma farmacéutica. Una vez absorbida, el fármaco queda expuesto a los procesos de distribución, metabolismo y eliminación. Como inicialmente existe mayor proporción del fármaco absorbida que distribuida, metabolizada y eliminada, la curva continúa su aumento hasta que se equiparan la entrada y la salida del fármaco. A este tiempo ($t_{máx}$), se alcanza la concentración pico ($C_{máx}$), y la curva nivel sanguíneo - tiempo declina a medida que la eliminación supera a la absorción (Fig. 56-1).

La velocidad y la magnitud de la liberación son dos factores que pueden modificar la forma de la curva. El mismo producto farmacéutico elaborado por diferentes fabricantes puede liberar el fármaco a distintas velocidades. La liberación lenta también puede ser intencional, como en el caso de las formas de dosificación de liberación lenta o sostenida. Sin embargo, si todo el fármaco es liberado, serán iguales las áreas bajo las curvas nivel sanguíneo - tiempo correspondientes a distintas formulaciones. Si el fármaco no es completamente liberado, podría presentarse un problema de biodisponibilidad, y el área bajo la curva sería menor. (Fig. 56-2). El término *biodisponibilidad* se refiere a la cantidad del fármaco sistémicamente absorbida.

El proceso de absorción puede estar influenciado por varios factores. Los alimentos (cuando el fármaco es administrado en forma oral antes, durante, o después de las comidas), pueden acelerar o prolongar la absorción, no tener efecto alguno, o incluso influenciar la magnitud de la misma. Por ejemplo, el nivel sanguíneo de griseofulvina aumenta en forma significativa cuando el fármaco se administra junto a grasas, mientras que el nivel sanguíneo de la tetraciclina disminuye cuando se ingiere junto con leche.

El volumen de distribución puede cambiar en varias condiciones patológicas. Si aumenta, el nivel sanguíneo disminuye y viceversa. En la insuficiencia cardíaca congestiva, disminuye el volumen de distribución para ciertos fármacos, como digoxina y quinidina, y por lo tanto, la misma dosis dará como resultado una mayor concentración (Fig. 56-3). Para aquellas drogas que son extensamente metabolizadas, los cambios en los niveles sanguíneos (Fig. 56-4) pueden ser el resultado de un metabolismo deficiente (por ejemplo, debido a daño hepático), o de la administración concomitante de otros fármacos que, o bien compiten por las vías metabólicas (inhibición enzimática), o bien aceleran el metabolismo (inducción enzimática).

La eliminación de fármacos, particularmente aquellos que son predominantemente eliminados por riñón, puede ser altamente prolongada en caso de daño renal o en personas de edad avanzada. La eliminación reducida puede dar como resultado una vida media de eliminación varias veces prolongada. Un ejemplo clásico son los aminoglucósidos: la vida media normal de la gentamicina es dos horas, pero puede fácilmente prolongarse a 20 o más horas (Fig. 56-5).

Efecto de los niveles elevados de fármacos

Como se enunció anteriormente, existe para muchos fármacos una relación entre la concentración del fármaco en sangre y las respuestas farmacológica y tóxica. Por lo tanto, un

aumento en los niveles sanguíneos está generalmente asociado con un aumento en la intensidad no sólo de la efectividad clínica sino también de la toxicidad. Para muchos fármacos es deseable alcanzar un rango terapéutico con la concentración pico o mantener durante el intervalo de dosis el nivel sanguíneo dentro del rango terapéutico. Una concentración por debajo del rango terapéutico es subterapéutica o inefectiva, y una concentración por encima del rango terapéutico es probablemente tóxica y puede causar efectos colaterales. Sin embargo, el rango terapéutico y subterapéutico, y el rango terapéutico y el rango tóxico a menudo se superponen (Fig. 56-6). Adicionalmente, se ha establecido un rango terapéutico que puede ser aplicado a la mayoría de los pacientes, pero que puede ser demasiado bajo o demasiado alto para un paciente individual. Un ejemplo de ello es la teofilina, para la cual el rango terapéutico está entre 10 y 20 microgramos/mL. Sin embargo, algunos pacientes están perfectamente controlados con niveles tan bajos como 5 microgramos/mL. Por otro lado, mientras la mayoría de los pacientes no experimentan los efectos colaterales de la teofilina a niveles aproximados a 23 µg/mL, algunos pacientes manifiestan signos tóxicos a esos niveles.

Necesidad del monitoreo en la terapia con fármacos

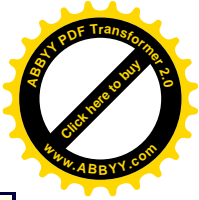
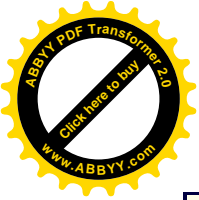
Muchos pacientes, tanto hospitalizados como ambulatorios, reciben más de un fármaco durante un día determinado, [ref\(2092\)](#) lo cual aumenta la probabilidad de enfermedad inducida por fármacos, interacción de fármacos, y efectos colaterales. Se ha descrito que uno de los fármacos más ampliamente usada, la cimetidina, interactúa con 21 fármacos diferentes. [ref\(2093\)](#) La imperiosa necesidad del monitoreo del fármaco también está indicada por el hallazgo de que 30 % a 50 % de las dosis administradas en hospitales y enfermerías fueron erróneas. [ref\(2094\)](#)

Otra razón para el monitoreo de fármacos es el incumplimiento con el régimen prescrito de dosis. Se describió en un estudio [ref\(2095\)](#) en el que el porcentaje de pacientes que no toma su medicación en la forma indicada oscila entre el 20% y el 82%. [ref\(2096\)](#)

El monitoreo de fármacos para todos los fármacos y para todos los pacientes no es posible ni tampoco factible. Más aún, el monitoreo del fármaco total no es, al menos por ahora, relevante para todos los fármacos. Hay otros fármacos, para los cuales la respuesta farmacológica es fácil, rápida y exactamente cuantificable, por lo cual es clínicamente más relevante monitorear directamente la respuesta clínica (tal como presión sanguínea, glucemia o excreción de electrolitos), en lugar del nivel sanguíneo del fármaco que la provoca.

Si un paciente está respondiendo bien a la terapia con fármaco sin presentar ningún signo de toxicidad, el correspondiente régimen de dosificación debe ser mantenido, aún cuando el nivel sanguíneo pudiera estar fuera del rango terapéutico normal. Podría contestarse a la pregunta "¿Para cuáles fármacos está indicado el monitoreo?", de la siguiente manera: el monitoreo está indicado para muchos grupos de fármacos, tales como fármacos antiepilépticos, agentes antiarrítmicos, anticoagulantes perorales, teofilina, antidepresivos tricíclicos, carbonato de litio y aminoglucósidos, que muestran gran variación individual, o que son tóxicos por encima de su rango terapéutico. La Fig. 56-7 presenta un diagrama en el que se muestran los factores que fundamentan la necesidad del monitoreo.

Regímenes de Dosis Usados para Lograr la Concentración Terapéutica



Deseada

Predicción de dosis para niveles terapéuticos en el estado estacionario

Muchos fármacos no son administrados en una dosis única, sino por medio de una serie de dosis administradas a intervalos específicos durante todo el transcurso de la terapia con el fármaco. Si el fármaco es administrado repetidamente usando intervalos de dosis más cortos que el tiempo requerido para eliminar del organismo el fármaco remanente de la dosis precedente, éste se *acumulará* hasta que se alcance un estado estacionario, o sea cuando la entrada y la salida del fármaco son iguales. El estado estacionario se obtiene cuando, con un régimen específico de dosis, la concentración pico ($C_{máx}^{ss}$, o concentración máxima en estado estacionario), y la concentración valle ($C_{mín}^{ss}$, o concentración mínima en estado estacionario), oscilan, luego de cada dosis, dentro de un cierto rango. El objetivo es lograr alcanzar el rango terapéutico. A partir de una curva de nivel sanguíneo - tiempo luego de una dosis individual, se pueden obtener los parámetros necesarios para predecir el estado estacionario, y a la inversa, la dosis requerida para alcanzar el estado estacionario deseado.

La *dosis de mantenimiento* requerida para mantener una concentración promedio deseada en el estado estacionario, C_{av}^{ss} , a un intervalo de dosis dado, t , depende de la magnitud de C_{av}^{ss} (la concentración del fármaco requerida en sangre para desencadenar la respuesta farmacológica), de los parámetros farmacocinéticos de disposición del fármaco, y del peso corporal del paciente. La ecuación general para determinar la dosis de mantenimiento correcta se muestra en el siguiente cuadro:[ref\(2097\)](#)

Factores que determinan una dosis individualizada *				
Dosis de mantenimiento (μg) DM	Depuración corporal total H mL/hr/kg Dt	Concentración promedio deseada para el estado estacionario ($\mu\text{g/mL}$) C_{av}^{ss}	Intervalo de la dosis (hr) τ	Peso corporal (kg) BW
\downarrow	\downarrow	\downarrow	\downarrow	\downarrow
Vd =	$K_e \text{ o } \beta$ X	Rango terapéutico X	Intervalo X	Composición corporal



Coeficiente de partición	Metabolismo:	Sensibilidad del receptor	Incremento o no del cambio con una dosis reducida	Relación de masa de grasa a masa muscular magra
líquido-agua aparente	Velocidad de flujo sanguíneo hepático	Número de receptores		Peso corporal de masa muscular magra
pKa	Actividad enzimática	Neurotransmisión		
Fluido	Cambios subcelulares	Homeostasis		
corporal total	Factores extrahepáticos			Peso corporal total
Grasa corporal total	Excreción:			
	Velocidad efectiva de flujo sanguíneo renal			
Magnitud de la unión de la proteína	Velocidad de filtración glomerular			
Velocidad de flujo sanguíneo tisular	Transporte activo celular			
	Cambios morfológicos			

*Para mayor información consulte a Ritschel WA: *Contemp Pharmacy Pract* 5:209-218, Washington, D.C., 1982, American Pharmaceutical Association.

† V_d , Volumen de distribución aparente (mL/kg); K_e o β , constante de velocidad de disposición terminal global (hr^{-1}); $Dt = V_d \cdot \beta$

Regímenes de dosis

El régimen de dosificación para una terapia de mantenimiento con dosis múltiples puede diseñarse de acuerdo a cinco métodos diferentes, dependiendo de la concentración deseada que se desee alcanzar o mantener durante cada intervalo de dosis. Es necesario conocer, para el propósito de monitoreo, cuál es el método utilizado, porque el protocolo óptimo de toma de muestra para el análisis de laboratorio depende del método en cuestión. Los cinco métodos se refieren a concentraciones en estado estacionario, y son los siguientes:

- 1- Método de la concentración efectiva mínima (CEM), o concentración inhibitoria mínima (CIM)
- 2- Método del pico ($C_{\text{máx}}^{\text{ss}}$).
- 3- Método de fluctuación limitada ($C_{\text{máx}}^{\text{ss}} - C_{\text{mín}}^{\text{ss}}$)
- 4- Método del log dosis - respuesta ($C_{\text{av}}^{\text{ss}}$)
- 5- Método de la ventana terapéutica (VT)

Método CEM o CIM.

Para que algunos fármacos sean efectivos deben alcanzar y mantener en el estado estacionario una concentración inhibitoria mínima (CIM), o una concentración efectiva mínima (CEM). Por encima de los valores de CIM o CEM, el fármaco será efectiva independientemente de la magnitud del pico alcanzado, siempre y cuando la curva completa de nivel sanguíneo - tiempo en estado estacionario esté por encima de la CIM o CEM requerida. Si la curva de nivel sanguíneo - tiempo cae por debajo del nivel de la CIM o CEM, el fármaco será inefectivo mientras la concentración permanezca por debajo de ese nivel.



Fármacos tales como antibióticos bacteriostáticos y otros agentes antimicrobianos (sulfonamidas), que tienen un *índice terapéutico* relativamente amplio, se prescriben frecuentemente con un régimen de dosificación calculado según este método.

Método del pico ($C_{m\acute{a}x}^{ss}$).

Es conveniente para algunos fármacos alcanzar una determinada concentración pico en el estado estacionario durante cada intervalo de dosis. Sin embargo, para el remanente del intervalo de dosis no se requiere que la concentración del fármaco permanezca por encima de un nivel mínimo. Este es el caso particular de los fármacos bactericidas, que sólo actúan sobre los microorganismos proliferantes, y en el cual no se quiere inhibir el crecimiento de aquellos microorganismos que no han sido matados por la dosis previa. Los fármacos que se prescriben frecuentemente con regímenes de dosificación basados en este método incluyen penicilinas, cefalosporinas, gentamicina y kanamicina.

Método de fluctuación limitada ($C_{m\acute{a}x}^{ss} - C_{m\acute{i}n}^{ss}$)

Para algunos fármacos podría ser deseable mantener en el estado estacionario una CIM o CEM a lo largo del intervalo de dosis sin nunca exceder un determinado valor de pico. Éste es el caso particular de aquellos fármacos que tienen un estrecho rango terapéutico. Los fármacos que podrían ser administrados usando este método para calcular la dosificación incluyen gentamicina, kanamicina, estreptomycin, isoniazida y teofilina.

Método del log dosis - respuesta (C_{av}^{ss})

Para los fármacos cuyo efecto clínico sigue una curva de log dosis - respuesta, las dosis del fármaco se eligen para estar ubicadas en la porción inferior de esa curva. Por ello, la concentración deseada en el estado estacionario está generalmente en el tercio inferior de la curva de log dosis - respuesta. Para este tipo de fármacos, la intensidad del efecto clínico (y también la toxicidad), se incrementa con el aumento de tamaño del pico. Los fármacos cuyas dosificaciones se basan generalmente en este método son digoxina, lidocaína, teofilina, procainamida, quinidina, antibióticos bactericidas, analgésicos, antipiréticos y agentes hipoglucemiantes.

Método de la ventana terapéutica (VT)

En algunos fármacos, como los antidepresivos y los antipsicóticos, el efecto clínico se incrementa con el tamaño de la dosis sólo hasta un cierto punto, y luego disminuye aún cuando la dosis se siga incrementando. En lugar de un rango terapéutico, existe una ventana terapéutica, que presenta una curva log dosis - respuesta con forma aproximada de campana.

Farmacocinética

Se define como el estudio cuantitativo de la disposición del fármaco en el organismo, y permite:

- 1- describir matemáticamente el destino de un fármaco, después de su



administración en una forma de dosificación dada por una determinada vía de administración.

- 2- comparar un fármaco con otros, o una forma de dosificación con otras formas de dosificación.
- 3- predecir los niveles sanguíneos de un fármaco con diferentes regímenes de dosificación o estados de enfermedad.

En farmacocinética, se usan básicamente tres tipos de procesos cinéticos para caracterizar el destino de los fármacos en el organismo: cinética de primer orden, o lineal; cinética de orden cero, o no lineal; y cinética de Michaelis-Menten o de saturación.

Cinética de primer orden

La mayoría de los procesos de ingreso del fármaco (absorción), difusión y permeación en el organismo (distribución), y excreción (eliminación urinaria), pueden describirse con cinéticas de primer orden o lineales, lo cual significa que la velocidad de cambio de concentración del fármaco es dependiente de la concentración del mismo. Cuando se representa gráficamente concentración *versus* tiempo en papel milimetrado, se obtiene una curva cóncava, y cuando se representa gráficamente en papel semilogarítmico se obtiene una línea recta. La relación está expresada por la ecuación 56-1:

$$dC / dt = - k \cdot C \quad \text{Ec. 56-1}$$

donde C es la concentración del fármaco, k es la constante de velocidad de primer orden, y t es el tiempo. El signo menos indica que la concentración de fármaco decrece con el tiempo. Un fármaco es eliminado de una manera que puede ser descrita por una cinética de primer orden cuando un *porcentaje constante* de fármaco es eliminado por unidad de tiempo. Las cinéticas de primer orden describen la eliminación de muchos fármacos, entre ellas, antibióticos y sulfonamidas, digoxina, lidocaína, procainamida y teofilina.

Cinética de orden cero

Si la velocidad de eliminación de un compuesto del organismo no es proporcional a la concentración del fármaco tomado, la eliminación sigue generalmente una cinética de orden cero o no lineal, lo cual significa que la velocidad de cambio de concentración es independiente de la concentración del fármaco respectivo. En otras palabras, más que una proporción constante, una *cantidad constante* de fármaco es eliminada por unidad de tiempo (la eliminación depende de la cantidad por unidad de tiempo). Cuando se representa gráficamente concentración *versus* tiempo en papel milimetrado, se obtiene una línea recta, mientras que en papel semilogarítmico se obtiene una curva convexa. El ejemplo clásico para cinéticas de orden cero es la eliminación de alcohol (etanol).

La relación puede ser expresada por la Ecuación 56-2:

$$dC / dt = - k_o \quad \text{Ec. 56-2}$$



donde la velocidad de cambio de concentración, dC/dt , es igual a la constante de velocidad de orden cero, k_0 , que tiene unidades de masa por unidad de tiempo.

Cinética de Michaelis-Menten

En el metabolismo, prácticamente todos los procesos de biotransformación son catalizados por sistemas enzimáticos específicos con una capacidad limitada para el fármaco. Los transportadores, responsables del transporte activo para fármacos a través de membranas, también tienen una capacidad limitada. Cuando la concentración de fármaco presente en un sistema dado excede la capacidad del sistema, la velocidad de cambio de concentración se describe más precisamente por la ecuación de Michaelis-Menten:

$$dC/dt = - (V_{m\acute{a}x} \cdot C) / (K_m + C), \quad \text{Ec. 56-3}$$

donde C es la concentración de fármaco, t es el tiempo, $V_{m\acute{a}x}$ es una constante que representa la máxima velocidad del proceso, y K_m es la constante de Michaelis, la concentración de fármaco a la cual el proceso transcurre exactamente a la mitad de su velocidad máxima.

Fenitoína, barbituratos en dosis altas y glutetimida son ejemplos de fármacos que muestran este tipo de cinéticas de saturación – eliminación.

Modelos compartamentales

Para describir los procesos cuantitativos de un fármaco en el organismo, la farmacocinética emplea el concepto de compartimentos. Un compartimento es una unidad caracterizada por dos parámetros: la concentración de fármaco, C , y el volumen, V_d . Multiplicando la concentración de fármaco por el volumen aparente de distribución, se obtiene la cantidad, A , de fármaco en ese compartimento:

$$C \cdot V_d = A \quad \text{Ec. 56-4}$$

Un modelo compartimental dado no es necesariamente específico para un fármaco dado. Por ejemplo, un fármaco administrado intravenosamente se describe con frecuencia por un modelo abierto de dos compartimentos, mientras que el mismo compuesto administrado oralmente o por otra vía extravascular, puede ser descrito por un modelo abierto de un compartimento. *Abierto* significa que hay entrada hacia y salida desde el compartimento.

En realidad, el cuerpo humano es un sistema de multimillones de compartimentos. Sin embargo, en el organismo intacto se tiene fácil acceso a sólo dos tipos de fluidos biológicos: sangre (suero, plasma), y orina. Estando restringida a sangre u orina, el fármaco tiene un destino en el organismo generalmente descrito por modelos abiertos de uno o dos compartimentos. Clínicamente hablando, el concepto de modelos de uno y de dos compartimentos es generalmente satisfactorio para uso terapéutico. La diferencia entre un modelo de un compartimento y otro modelo de dos compartimentos, es que en el primero la distribución ocurre instantáneamente, mientras que en el último, el proceso de distribución



necesita de un tiempo cuantificable antes de que el pseudoequilibrio sea alcanzado.

Constante de velocidad de eliminación final

En el modelo abierto de un compartimento, la última porción o porción terminal de la pendiente recta (monoexponencial) de una curva semilogarítmica de nivel sanguíneo - tiempo permite obtener la constante global de velocidad de eliminación, k_e , (metabolismo, excreción renal, y otras vías de eliminación). En el modelo de dos compartimentos, permite obtener β , la constante de velocidad de eliminación lenta (Figs. 56-9 y 56-10).

Nivel sanguíneo a tiempo cero

En la curva de nivel sanguíneo – tiempo, luego de una administración intravenosa, la extrapolación resulta ser C_0 , el nivel sanguíneo a tiempo cero. Luego de una administración extravascular, el nivel sanguíneo a tiempo cero "ficticio", C_0 , es la intercepción de la pendiente k_e con la ordenada en un gráfico semilogarítmico para el modelo de un compartimento, y la suma de las intercepciones A + B de las pendientes α y β para el modelo de dos compartimentos (Figs. 56-9 y 56-10).

Constante de velocidad de absorción

La pendiente k_e se extrapola a tiempo cero, dando por resultado C_0 , una concentración teórica aproximadamente equivalente a aquella obtenida a partir de una inyección intravenosa de la misma cantidad de fármaco.. Por sustracción de la concentración de fármaco observada durante la fase de absorción, de la concentración leída de la pendiente extrapolada k_e , se obtienen puntos *residuales*, que cuando se representa gráficamente en papel semilogarítmico, generan una línea recta, cuya pendiente es la constante de velocidad de absorción k_a (Fig. 56-9), para el modelo de un compartimento.

Vida media de eliminación

Siempre que una línea recta monoexponencial sea obtenida, puede calcularse la vida media de un fármaco. Nótese la línea que describe los términos k_e y β en las (Figs. 56-9 y 56-10). Otras vidas medias usadas frecuentemente son la vida media de absorción ($t_{1/2 \text{ abs}}$) y la vida media de distribución ($t_{1/2}$).

Los términos *tiempo medio*, *vida media*, *vida media plasmática*, *vida media de eliminación*, y *vida media biológica* se usan a menudo indistintamente. La vida media es igual al tiempo requerido para la eliminación de la mitad de la dosis total de fármaco del organismo. La vida media de eliminación, o vida media plasmática, es el tiempo requerido para la eliminación de la mitad de la cantidad de fármaco presente en la sangre (plasma o suero). En aquellos casos en los cuales la disminución de las concentraciones de fármaco en todos los tejidos no es paralela a la disminución de la concentración de fármaco en plasma, sangre o suero, la vida media y la vida media de eliminación serán diferentes. La mayoría de los conceptos sobre disposición de fármaco se refieren a la vida media de eliminación. En la Fig.



56-10 se representa gráficamente la vida media de eliminación ($t_{1/2}$).

Volumen de distribución

El volumen de distribución no es un volumen real, y generalmente no tiene relación con algún espacio fisiológico o con algún volumen de fluido corporal. Es simplemente un término para hacer válida la ecuación de balance de masa. En la administración intravenosa, la cantidad de fármaco en el cuerpo es conocida. Sin embargo, sólo pueden extraerse muestras de sangre. Dado que una cantidad de fármaco, A , iguala el producto de concentración por volumen (microgramos/mL \times mL), el volumen de distribución es el volumen hipotético que sería requerido para disolver la cantidad total de fármaco de modo de alcanzar la misma concentración que se encuentra en la sangre.

El volumen de distribución se expresa en mililitros. Si este valor se divide por el peso corporal del paciente, se obtiene el coeficiente de distribución, Δ' , en mL/g, o L/kg.

Area bajo la curva de nivel sanguíneo - tiempo

La integral debajo de una curva de nivel sanguíneo-tiempo es una medida de la cantidad total de fármaco en el organismo. Puede calcularse el área bajo la curva de nivel sanguíneo - tiempo desde tiempo cero a infinito, AUC (más conocida por su acrónimo en inglés por "Area Under the Curve"), o puede obtenerse por aproximación representando la curva en papel gráfico, recortando el área y pesándola. (Fig. 56-11).

Depuración total

En farmacocinética, la depuración total describe cuánto del volumen de distribución del fármaco se depura por unidad de tiempo, sin considerar las vías de pérdida del fármaco del organismo. En efecto, es la suma de todos los procesos de depuración que se realizan por diferentes rutas. La depuración total es el producto del volumen aparente de distribución y la constante de velocidad de eliminación final.

Estado estacionario

El estado estacionario se refiere a la acumulación de fármaco en el organismo, después de dosis múltiples, cuando la entrada y la salida de fármaco son iguales dentro de un intervalo de dosis. La magnitud de la acumulación depende de la vida media de eliminación del fármaco y del intervalo de dosis. Cuanto menor sea el intervalo de dosis para una dosis dada, mayor será la acumulación y menor será la fluctuación alrededor del valor promedio en suero. En el estado estacionario, la concentración de fármaco oscila alrededor de una concentración promedio, C_{av}^{ss} , con una definida concentración máxima de estado estacionario, $C_{máx}^{ss}$, y una concentración mínima de estado estacionario, $C_{mín}^{ss}$. Las tres concentraciones mencionadas son idénticas solamente en el caso de una infusión intravenosa continua.



Aplicación de la Farmacocinética al MFT

Evaluación clínica

La evaluación clínica o médica de la respuesta del paciente es la primera y más importante tarea del monitoreo terapéutico. No debe olvidarse que toda terapia requiere de un enfoque que considere todos los aspectos de la condición del paciente, incluyendo la propia enfermedad y sus síntomas, otras enfermedades presentes, su condición física general, edad, estado nutricional, y aspectos psicológicos. Es más, no debe olvidarse que la farmacocinética clínica es una herramienta útil que puede ayudar, pero nunca substituir a la evaluación clínica.

Aplicación.

La evaluación clínica de la respuesta del paciente comprende la evaluación de sus signos vitales y el cambio de los síntomas en respuesta a la terapia con el fármaco, por ejemplo, presión sanguínea, pulso, electrocardiograma, medición de edema y excreción urinaria. Además, pueden ser requeridos análisis de laboratorio, tales como glucosa en suero y electrolitos. En todos los casos, la respuesta farmacológica es evaluada *clínicamente*, ya sea por medición directa del efecto farmacológico o por medición de parámetros bioquímicos, pero *no* por la medición de la concentración de fármaco en fluidos biológicos.

Limitaciones.

A veces, la evaluación clínica podría ser difícil debido a la presencia de dos o más estados de enfermedad con síntomas similares o superpuestos, polifarmacia (varias fármacos administradas simultáneamente), o resultados *inesperados*. Estos últimos aparecen cuando el paciente (1) no responde de acuerdo a lo esperado, mostrando poca o ninguna efectividad de la terapia, o (2) presenta inesperados efectos colaterales o tóxicos.

Una fármaco puede ser menos efectiva de lo esperado porque: (1) tiene baja biodisponibilidad, (2) el paciente no cumple con las indicaciones prescritas, (3) existe un síndrome de mala absorción, y debido al mismo, la cantidad de fármaco absorbida es menor de la esperada. Un paciente puede exhibir toxicidad inesperada o efectos colaterales a causa de las interacciones entre fármacos, inducción enzimática, inhibición enzimática, falla renal o hepática, edema, deshidratación, etc. En estos casos es aconsejable, cuando sea posible, solicitar el monitoreo de fármacos en muestras biológicas (ver Fig. 56-7 y el cuadro A).

Evaluación por análisis de fármacos

Cuando se conoce la concentración terapéutica deseada, el rango terapéutico o la concentración tóxica, el monitoreo de fármacos terapéuticos puede ser usado para avalar la evaluación clínica. Cuando un paciente está tratado con fármacos de bajo índice terapéutico, tales como los aminoglucósidos, digoxina y compuestos de litio, o cuando aparecen efectos colaterales inesperados o toxicidad (ver Fig. 56-7) y debe efectuarse el monitoreo de fármacos terapéuticos.

Bases para el monitoreo.

Es esencial para el monitoreo completar ciertos requerimientos, pues de otro modo, cualquier evaluación será errónea:[ref\(2098\)](#)



1. Debe conocerse la dosis, la forma de dosificación y la vía de administración.
2. Debe seguirse el régimen de dosificación.
3. Debe conocerse el tiempo entre la administración de la última dosis y la extracción de la muestra sanguínea.
4. Debe registrarse con exactitud el tiempo o tiempos de muestreo sanguíneo.
5. Los tiempos de muestreo deben ser apropiados.

Los requerimientos enumerados anteriormente son por sí mismos explicativos. Para entender el punto 5, debe recordarse que cualquier muestra tomada durante las fases de absorción o distribución no es útil para el monitoreo. Las muestras tomadas en el tiempo pico permiten sólo una aproximación de datos farmacocinéticos. Las muestras tomadas en el tiempo pico y durante la fase final de eliminación resultarán en una sobreestimación de la constante de velocidad de eliminación y en una subestimación de la vida media de eliminación.

Los tiempos óptimos de muestreo para varios métodos de regímenes de dosificación figuran en la Fig. 56-12. En la Tabla 56-1 figuran los tiempos de muestreo, las vidas medias de eliminación y los rangos terapéuticos de 18 fármacos comúnmente monitoreadas.[ref\(2099\)](#)

Limitaciones.

La capacidad de monitorear un fármaco específico en una muestra sanguínea puede a veces estar limitada porque (1) no está disponible la información exacta acerca de los tiempos de administración de fármaco y de extracción de sangre, (2) no está disponible un método de ensayo confiable, y (3) no es razonable el tiempo de análisis de laboratorio. La mayoría de las dificultades experimentadas en el monitoreo son causadas por información limitada o inexacta, debiendo también considerarse la precisión del ensayo. El coeficiente de variación de un ensayo puede ser importante cuando la concentración de fármaco se encuentra en el extremo inferior o superior del rango terapéutico. Los rangos terapéuticos reportados en la Tabla 56-1 son valores promedio aplicables a la mayoría de los pacientes. Debe recordarse que la concentración terapéutica o la concentración tóxica pueden ser diferentes para un paciente en particular (ver Fig.56-6).

Evaluación por cálculos farmacocinéticos

Para evaluar muestras de sangre farmacocinéticamente, debe conocerse si la concentración de fármaco corresponde al estado estacionario. Para decidir si se ha alcanzado el estado estacionario, es necesario conocer el régimen de dosificación (dosis e intervalo de dosis) y por cuánto tiempo ha estado vigente este régimen de dosificación. Generalmente, se asume que se alcanza un estado estacionario cuando el régimen de dosificación ha sido implementado por un tiempo mayor a cuatro veces la vida media de eliminación del fármaco. Si el régimen ha estado en vigencia por menos de 4 vidas medias, debería saberse el número de dosis administradas antes de obtener la muestra. Usando las ecuaciones farmacocinéticas clásicas, puede calcularse cuál sería la concentración de fármaco, basándose en parámetros farmacocinéticos promedio de la literatura y en la información propia del paciente (edad, peso corporal, sexo, altura, estado renal, etc.). El propósito del monitoreo de fármacos es comparar la concentración de fármaco observada con la esperada o deseada. La concentración



observada puede ser igual, menor, o mayor que la deseada. En los últimos dos casos puede indicarse y recomendarse un ajuste del régimen de dosificación.

Si la concentración de fármaco medida, C_x , difiere de la concentración deseada (C_{av}^{ss} , o $C_{máx}^{ss}$), debe tratarse de encontrar la razón de la desviación. Enseguida se presentan algunas causas generales y probables.

Una concentración mayor que la esperada podría asociarse con una biodisponibilidad incrementada de un fármaco de biodisponibilidad generalmente baja (por ejemplo, la cimetidina incrementa la biodisponibilidad del propranolol), incumplimiento del paciente (tal como uso de mayor cantidad de fármaco o a intervalos de dosificación más cortos que los prescritos, o depuración total disminuida (como ocurre en el fallo renal o hepática y en la insuficiencia cardíaca congestiva), o aumento de la unión a proteínas. Una concentración menor que la esperada podría ser el resultado de una biodisponibilidad disminuida (posible interacción con otros fármacos), dosificación insuficiente de fármaco (intervalos de dosis más largos, dosis perdidas, o incumplimiento), incremento en la depuración total (interacción de fármacos o inducción enzimática), o disminución de la unión a proteínas.

Análisis farmacocinéticos más complejos

Las ecuaciones anteriormente presentadas son básicas, pero razones de espacio y conocimiento previo impiden el tratamiento del tema en forma más detallada. El propósito de este capítulo es presentar una revisión general y transmitir una comprensión general de los principios farmacocinéticos involucrados, incluyendo los regímenes de dosificación.

Parte II: Aspectos prácticos del MFT

MICHAEL OELLERICH

VICTOR W. ARMSTRONG

Rango Terapéutico

Aunque los rangos terapéuticos han sido establecidos empíricamente en numerosos estudios clínicos para ayudar a la interpretación de las mediciones de fármacos, la concentración de fármaco debe ser siempre interpretada en el contexto de todos los datos clínicos. A diferencia de los intervalos de referencia en química clínica, no hay un concepto o protocolo aceptado generalmente acerca de cómo establecer el rango terapéutico de un fármaco. Estos rangos terapéuticos, por lo tanto, varían ligeramente en toda la literatura y deberían usarse sólo como una guía general. Ellos representan el rango de concentraciones de fármaco dentro del cual es relativamente alta la probabilidad de la respuesta clínica deseada y es relativamente baja la probabilidad de toxicidad inaceptable. Los médicos nunca deben asumir, sin embargo, que una concentración sérica dentro del rango terapéutico es segura y efectiva para cada paciente. Los rangos terapéuticos recomendados para algunos fármacos comúnmente monitoreados figuran en la Tabla 56-1. Las concentraciones séricas dentro del



rango terapéutico de un fármaco producirán una respuesta farmacológica en la mayoría de los pacientes. A concentraciones por encima del límite superior del rango terapéutico puede esperarse una mayor incidencia de efectos tóxicos colaterales sin que aparezca por regla general un progreso sustancial en el efecto terapéutico. El rango entre la concentración de fármaco requerida para producir la respuesta terapéutica y aquella que produce un efecto tóxico determina cuán cuidadosamente debe monitorearse la dosificación del fármaco. La relación entre estas concentraciones se llama *índice terapéutico*, y se expresa como la mínima concentración (o dosis) que produce toxicidad dividida por la mínima concentración (o dosis) que produce la respuesta terapéutica en una población de pacientes. Cuando esta relación es igual o menor de 2, el compuesto puede ser difícil de utilizar sin que aparezca en los pacientes significativa toxicidad. En la Tabla 56-1 figuran los valores de concentración tóxica de fármaco por encima de los cuales existe una alta probabilidad o un aumento de la probabilidad de efectos adversos.

Los rangos terapéuticos pueden necesitar un ajuste si se administran conjuntamente otros fármacos con acción sinérgica o antagónica. Una concentración sérica de fenitoína considerada dentro del rango terapéutico, puede provocar síntomas tóxicos cuando están presentes otros fármacos de acción depresora sobre el sistema nervioso central. Cuando se interpretan concentraciones séricas, también deben tomarse en consideración la existencia de metabolitos farmacológicamente activos y alteraciones en la unión a proteínas. Cuando ciertas fármacos, como el fenobarbital, son administradas durante largo tiempo, los pacientes pueden desarrollar tolerancia a el fármaco, y puede aumentar el valor del límite superior del rango terapéutico.

Las concentraciones deseadas para ciclosporina A dependen de la indicación para el tratamiento, del tiempo posterior a la iniciación de la terapia, y de la terapia inmunosupresiva concurrente.[refs\(2100\)](#) Por lo tanto, el rango terapéutico para ciclosporina A puede tomarse sólo como una guía general. Muchos centros de trasplante[ref\(2101\)](#) recomiendan concentraciones deseadas más altas durante el período temprano postoperatorio y luego ir disminuyendo las dosis hasta alcanzar una concentración de mantenimiento menor, generalmente tres a seis meses después del trasplante.

Para una correcta interpretación de los niveles de fármacos, es imperativo conocer el intervalo de tiempo entre la administración de la última dosis y la extracción de sangre. Las tomas de muestras siempre deben ser realizadas en el estado estacionario para terapias de largo plazo. En la práctica, las muestras generalmente se toman después de transcurridas cuatro a cinco vidas medias, cuando normalmente se ha alcanzado más del 90 % de la concentración correspondiente al estado estacionario (Fig. 56-8). Se mide la concentración pico o la concentración valle inmediatamente antes de la administración de la próxima dosis, dependiendo de cual sea el interrogante clínico a responder. Cuando un fármaco es administrada por infusión intravenosa, las muestras de sangre deben tomarse después de que la fase inicial de distribución se ha completado, generalmente una a dos horas después. Sin embargo, para digoxina y digitoxina el tiempo para llegar al equilibrio después de la administración oral o intravenosa es normalmente de ocho a doce horas. Para que las concentraciones en suero reflejen mejor el efecto en la actividad cardíaca, las muestras deben tomarse cuando el fármaco alcanzó el equilibrio entre suero y tejido.[ref\(2102\)](#)

Para fármacos como fenitoína y fenobarbital, el tiempo de muestreo no es importante,



porque son relativamente pequeñas las fluctuaciones entre las concentraciones pico y valle en el estado estacionario. Para fármacos como teofilina, de estrecho rango terapéutico y corta vida media, puede ser necesario obtener muestras de sangre en ambos niveles, pico y valle, para determinar si se utiliza la correcta dosificación. En el caso de dosis múltiples diarias de aminoglucósidos, también deben monitorearse ambos valores, pico y valle, para prevenir la administración de dosis inapropiadamente elevadas, que podrían predisponer al paciente a la nefrotoxicidad u ototoxicidad.[ref\(2103\)](#) Para dosis diarias únicas,[ref\(2104\)](#) puede ser necesario solamente monitorear el nivel valle, o un nivel obtenido a un intervalo definido después de la infusión.[ref\(2105\)](#)

Algunas de las causas más comunes para explicar los inesperados resultados de concentraciones séricas de fármaco que pueden aparecer en ciertos pacientes, figuran en el cuadro A de páginas anteriores. Será necesario ajustar la dosificación del fármaco si estos factores no pueden ser eliminados, o si no puede asegurarse el adecuado cumplimiento por parte del paciente.

Métodos de Predicción de Dosis

La estimación de la dosis requerida para alcanzar una concentración de fármaco en el rango terapéutico ha sido establecida basándose en los niveles hallados en poblaciones control. El uso de esta información se denomina dosificación farmacocinética basada en la población. Los valores estimados se presentan en forma de tablas o nomogramas que permiten al médico elegir la dosis adecuada basándose en ciertos rasgos del paciente (por ejemplo edad, enfermedades, hábito de fumar). Aunque estos métodos no son caros, tienen frecuentemente un importante error de predicción. Por ello, para facilitar la adaptación de la dosificación individual, han sido desarrollados métodos de predicción que permiten estimar en un individuo la depuración del fármaco a partir de unas pocas mediciones de su concentración.

Ajuste de la dosificación en el estado estacionario

La depuración es el parámetro más importante a considerar cuando se pretende diseñar un régimen de dosificación racional. En el estado estacionario, se puede estimar fácilmente la depuración, dividiendo la velocidad de dosificación por la concentración sérica promedio de fármaco en dicho estado estacionario. Para aquellos fármacos que presentan una depuración linealmente proporcional a la dosis, puede calcularse la dosis nueva (DN) para alcanzar la concentración deseada a partir de la dosis real (DR), la concentración sérica real en estado estacionario (CR), y la concentración sérica deseada (CD), de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$DN = DR / CR \times CD$$

Ec. 56-5

En la práctica, son empleadas las concentraciones valle en lugar de las concentraciones promedio en estado estacionario. El uso de la ecuación 56-5 es limitado en aquellos pacientes cuyos parámetros LADME se encuentran en los extremos de los rangos habituales. En esos casos, los niveles pico y valle pueden no modificarse de una manera lineal después de un ajuste

de la dosificación. Debido a ello, para estimar los parámetros farmacocinéticos individuales, se utilizan métodos más sofisticados que emplean un pequeño número de mediciones de concentraciones séricas. Los valores estimados son usados para predecir el esquema óptimo de dosificación, para cuando las mediciones no se realizan en condiciones de estado estacionario, o para aquellos fármacos cuya eliminación no puede ser descrita por una cinética de primer orden.

Métodos de tres puntos de Sawchuk

El método de Sawchuk para la predicción de la dosificación requiere de la determinación de (1) un nivel de pre dosis, (2) una concentración del fármaco obtenida 30 minutos después de la finalización de una infusión intravenosa continua, y (3) una concentración adicional medida una hora antes de la próxima dosis.[ref\(2106\)](#) Si se asume un modelo de un compartimento, la constante de velocidad de eliminación puede estimarse de la pendiente de la curva concentración - tiempo (ver Fig. 56-9). El volumen de distribución, V_d , puede calcularse de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$V_d = \frac{D}{t \cdot k} \times \frac{(1 - e^{-k t})}{(C \cdot e^{-k t} - C_0 \cdot e^{-k t})} \quad \text{Ec. 56-6}$$

donde:

D	=	dosis
t	=	duración de la infusión continua
k	=	constante de velocidad de eliminación
C_0	=	nivel de pre dosis
C	=	concentración inicial teórica

La depuración, D_p , será el producto de la constante de velocidad de eliminación k por el volumen de distribución V_d .

Predicción Bayesiana

La depuración y el volumen de distribución de un paciente individual pueden ser obtenidos a partir de la aplicación de la fórmula de Bayes a la estimación de parámetros farmacocinéticos.[ref\(2107\)](#) Esta aproximación utiliza información obtenida previamente acerca del rango de distribución de los parámetros farmacocinéticos dentro de la población, en combinación con los datos de una o más concentraciones séricas del fármaco observadas en forma individual.

La estimación de los parámetros farmacocinéticos en el paciente individual se obtienen a partir de la fórmula de Bayes. Puede mejorarse la calidad de la estimación tomando en cuenta datos específicos del paciente (como edad, sexo, enfermedades, medicación).



Teniendo los datos correspondientes al paciente, se obtiene el mejor ajuste para los valores de depuración y volumen de distribución. Estos programas Bayesianos están disponibles actualmente en forma comercial y pueden aplicarse a distintos fármacos.[refs\(2108\)](#) El valor prospectivo del modelo de predicción Bayesiano ha sido demostrado en pacientes recibiendo aminoglucósidos.[refs\(2109\)](#) Las recomendaciones de tipo farmacocinético clínico facilitadas por el laboratorio conducen a menores costos directos de hospitalización, incluyendo reducción de la estancia en el hospital, ilustrando así el efecto de ahorro de costos provocado por el uso racional de los modelos predictivos para el monitoreo de fármacos terapéuticos.

Indicaciones clínicas para el MFT

La necesidad de monitoreo es muy dependiente del estado clínico del paciente para aquellos fármacos de las cuales se conoce su respuesta a la dosis y su toxicidad.

Las indicaciones clínicas para la necesidad de obtener información acerca de las concentraciones del fármaco figuran en el cuadro siguiente:

Situaciones clínicas que requieren MFT
Sospecha de sobredosis del fármaco *
Ausencia de efecto terapéutico
Problemas de cumplimiento
Efectos tóxicos indiferenciables de los síntomas específicos de la enfermedad
Interacción con otros fármacos o terapia multifármaco
Fármaco utilizada profilácticamente
Etapas de la enfermedad que alteran la respuesta farmacocinética
Optimización de la dosis en el paciente crítico *
Medicación desconocida, como ocurre en un paciente en estado de coma *
Terapia de rescate con leucovorina durante el tratamiento con altas dosis de methotrexate *
*Indicaciones para medir los niveles del fármaco en un laboratorio capaz de realizar pruebas de urgencia

En la aplicación profiláctica de fármacos es esencial conocer si la concentración del fármaco se encuentra en el rango terapéutico deseado para prevenir los síntomas de la enfermedad. Un ejemplo típico es la determinación de los niveles de teofilina para asegurarse que están dentro del rango que previene los ataques de asma.

El conocimiento de las concentraciones del fármaco es crítico para el manejo del paciente cuando son similares los síntomas provocados por la toxicidad del fármaco y los



propios de la enfermedad subyacente. Pueden citarse los siguientes ejemplos:

- (1) Las contracciones ventriculares prematuras pueden indicar tanto una enfermedad cardíaca intrínseca, como toxicidad a digitalis.
- (2) Niveles elevados de quinidina o procainamida pueden inducir arritmias ventriculares similares a las controladas terapéuticamente por estos mismos fármacos.
- (3) La taquicardia no puede utilizarse para diagnóstico de sobredosis con teofilina, porque también está presente en pacientes con obstrucción respiratoria severa.
- (4) Dosis tóxicas de fenitoína pueden provocar convulsiones, que son también sintomáticas de la enfermedad epiléptica subyacente.

La medición de los niveles del fármaco en suero es requerida para optimizar la dosificación del fármaco en los casos en los que se sospecha una interacción con otros fármacos, o cuando se conoce que el fármaco en cuestión presenta considerable variabilidad farmacocinética intraindividual e interindividual. Debe enfatizarse que cuando el paciente está severamente enfermo, la absorción del fármaco, la unión a proteínas, y la eliminación del fármaco, pueden modificar la concentración del fármaco efectiva, o facilitar la acumulación de metabolitos potencialmente tóxicos. La determinación de las concentraciones del fármaco es necesaria cuando se sospechan cambios en su biodisponibilidad o cuando aparecen efectos adversos en forma persistente. El monitoreo también es necesario para evitar la toxicidad que se observa, por ejemplo, en pacientes bajo tratamiento con altas dosis de methotrexate, donde las severas reacciones adversas son generalmente evitables si las dosis del antídoto correspondiente, leucovorina, se ajustan de acuerdo a las concentraciones séricas de methotrexate.

Muestro y Frecuencia del Monitoreo de Fármacos

Muestreo

Se utilizan muestras de suero o plasma para la determinación de los niveles circulantes de la mayoría de los fármacos. Sin embargo, hay excepciones como la ciclosporina A,^{[refs\(2110\)](#)} para la cual la matriz preferida es sangre entera. En el monitoreo de fármacos terapéuticos, son de fundamental importancia la exactitud y precisión del tiempo de administración del fármaco y del tiempo al cual se obtiene la muestra de sangre. Este parámetro, el tiempo, es frecuentemente el más difícil de respetar. Los programas de aseguramiento de calidad deben estar dirigidos a asegurar la obtención de esa información. Los tiempos de toma de muestra para los fármacos más comúnmente monitoreados figuran en la Tabla 56-1. La muestra debe estar acompañada de un formulario que contenga todos los datos demográficos del paciente, como así también, fecha y hora de extracción. Deben incluirse también los datos de cantidad de dosis, intervalo de dosis, tiempo desde la última dosis, vía de administración, y otras medicaciones administradas.

Frecuencia del monitoreo de fármacos



Además de los casos críticos descritos anteriormente, la frecuencia del monitoreo dependerá mucho de la situación clínica del paciente, la experiencia del médico, la vida media del fármaco, y si las concentraciones séricas alcanzaron o no el estado estacionario.

En pacientes críticos tratados con fármacos como los aminoglucósidos, que tienen rápidos cambios en su depuración, puede ser necesaria una modificación diaria de la dosis del fármaco. Para otros fármacos, como la ciclosporina A, la variabilidad de la respuesta, y por lo tanto, la variabilidad de la dosis requerida, implica que el monitoreo del nivel sanguíneo de este fármaco debe empezar inmediatamente después de la iniciación de la terapia. En estos casos, hay que recordar que el fracaso para alcanzar una adecuada concentración en sangre puede ser fatal debido a que la sobredosis provoca severos efectos tóxicos. Sin embargo, el monitoreo puede relajarse con el tiempo por razones de conveniencia y de costos. El monitoreo de los niveles de ciclosporina A se realiza de 4 a 7 veces por semana durante la hospitalización temprana post-transplante, después de un transplante de hígado, corazón o riñón. Después de este monitoreo inicial intensivo, las mediciones de los niveles sanguíneos pueden gradualmente reducirse. Por ejemplo, en casos de pacientes que recibieron un transplante renal, y tienen una evolución sin complicaciones, las concentraciones de ciclosporina A deben ser monitoreadas una vez por mes durante el primer año, y en adelante, a intervalos de 1 a 3 meses.^{ref(2111)} Sin embargo, no hay reglas fijas ni rígidas, y las mediciones deben ser realizadas si los signos clínicos o síntomas indican la necesidad de un ajuste de la dosis.

El monitoreo frecuente suele ser requerido cuando se inicia una terapia con una determinado fármaco, o cuando se busca optimizar la dosis de la misma. Por ejemplo, en aquellos pacientes con insuficiencia renal moderada a severa, el monitoreo frecuente (en este caso, a diario) de los niveles séricos de digoxina es conveniente al inicio de la terapia, debido a la variabilidad del volumen de distribución y a la variabilidad de la eliminación, asociadas a una función renal disminuida. El conocimiento de las concentraciones del fármaco es particularmente importante cuando se administra una alta dosis. Las mediciones frecuentes pueden ser necesarias para monitorear si fue apropiada una modificación del régimen de dosificación, o para evaluar los cambios de la concentración sérica de digoxina inducidos por interacción con otros fármacos.

La frecuencia de monitoreo generalmente disminuye para pacientes ambulatorios que reciben un determinado fármaco según una terapia de largo plazo. La frecuencia es en parte dependiente del propio fármaco. Las mediciones de las concentraciones séricas de teofilina son esenciales para el manejo del paciente, debido a su estrecho índice terapéutico y a la relación de la concentración sérica con su eficacia y con su toxicidad. Deben monitorearse durante la fase inicial hasta que se alcance el estado estacionario, y a partir de ese momento, a intervalos regulares, de 6 a 12 meses. Las concentraciones séricas de fenitoína deben monitorearse después de la iniciación de la terapia, para determinar si se alcanzó una concentración terapéutica en suero. Las mediciones pueden realizarse dos semanas a un mes después de iniciada la terapia, porque a ese tiempo generalmente se alcanza el estado estacionario.

El dato de la concentración medida debe ser utilizado en forma conjunta con información clínica relevante con el objeto de decidir si se requiere un ajuste de la dosis diaria. En aquellos pacientes con fracasos terapéuticos, signos de sobredosis, o sospecha de incumplimiento, una respuesta inmediata es necesaria para obtener la apropiada medición de



la concentración sérica del fármaco.

La terapia con altas dosis de methotrexate requiere el monitoreo seriado de las concentraciones séricas de methotrexate durante la fase de rescate con leucovorina, porque la dosis necesaria de leucovorina depende del nivel de methotrexate en suero.

En pacientes con función renal normal, generalmente es suficiente la medición de los niveles séricos de methotrexate a las 24, 48 y 72 horas.

Tiempos de entrega de resultados

Un servicio de laboratorio, que entregue los resultados de las mediciones de las concentraciones séricas del fármaco en el mismo día, es apropiado para la mayoría de los fármacos que figuran en la Tabla 56-1. Cuando es necesario un ajuste de la dosis, los resultados serán obviamente requeridos antes de la administración de la dosis siguiente. Dado que los niveles de aminoglucósidos son solicitados tanto en su nivel pico como en su nivel valle, es más exacto y eficiente obtener ambas muestras durante el mismo intervalo de dosis. El laboratorio puede medir ambos niveles en la misma tanda analítica y minimizar así la varianza. Esta respuesta inmediata del laboratorio permite frecuentemente entregar los resultados al médico solicitante en el mismo día, brindando así el tiempo suficiente para establecer un nuevo régimen de dosificación.

Análisis de urgencia (tipo stat)

En ciertas situaciones clínicas, puede ser necesaria la inmediata determinación de los niveles séricos del fármaco. Algunas de las indicaciones más importantes para la rápida medición de los mismos, figuran en el cuadro B. Los fármacos que más probablemente requieran ser monitoreadas por un laboratorio de urgencia (tipo stat) figuran en el cuadro C, y pueden ser divididas en dos categorías, dependiendo de la urgencia del análisis.

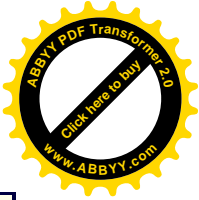
Fármacos para los cuales debe disponerse de análisis tipo stat en el laboratorio de urgencia

Análisis tipo stat en sospecha de sobredosis

Teofilina
Digoxina
Fenitoína, Fenobarbital, Carbamazepina
Ácido salicílico, acetaminofeno
Litio, antidepresivos tricíclicos, barbituratos, benzodiazepinas

Otros análisis

Tobramicina, amikacina, gentamicina, netilmicina
Ciclosporina, tacrolimus (FK506)
Methotrexate



Si se sospecha de una sobredosis, inmediatamente debe llevarse a cabo un análisis, porque es una situación con potencial riesgo de muerte. La medición de antidepresivos tricíclicos en intentos de suicidio es un ejemplo de lo mencionado. El conocimiento de los niveles del fármaco padre y metabolitos es útil para dilucidar la intoxicación con estos fármacos.

Ocasionalmente, los análisis deben realizarse fuera de la rutina normal de trabajo del laboratorio o fuera de los horarios habituales. Ejemplos: (1) la determinación urgente de los niveles séricos de aminoglucósidos en enfermos críticos para quienes es necesario un ajuste en la dosis individual, (2) protocolos específicos de tratamiento con altas dosis de methotrexate y terapia de rescate con leucovorina, en los que es necesario conocer las concentraciones séricas de methotrexate, (3) medición de los niveles de ciclosporina A y tacrolimus, que pueden ser requeridos los siete días de la semana, particularmente después de un trasplante hepático.

Aseguramiento de la Calidad

Control de Calidad

Los programas de control de calidad utilizan materiales de control de calidad comercialmente disponibles, como así también programas específicos para MFT. El MFT se diferencia de otras determinaciones de química clínica en que el nivel del compuesto analizado se alcanza modificando la dosis administrada. Por ello, los médicos tienen que tener confianza en los datos de las concentraciones medidas, y para el laboratorio es importante alcanzar una exactitud satisfactoria y una precisión analítica que estén dentro de límites aceptables. Han sido propuestos ciertos indicadores de calidad basados en la teoría farmacocinética y en estrategias de consenso.[ref\(2112\)](#) Recientemente, han sido aplicados principios estadísticos para el establecimiento de objetivos analíticos para la determinación de la concentración de teofilina en suero.[ref\(2113\)](#)

Aviso de valores críticos

A veces, es necesario comunicar en forma urgente una concentración crítica del fármaco al médico o institución de salud solicitante. Los valores críticos incluyen altas concentraciones asociadas con riesgo aumentado de toxicidad para ese fármaco particular (ver Tabla 56-1), o bajas concentraciones inadecuadas para lograr el efecto terapéutico deseado. Como posibles causas de concentraciones inesperadas del fármaco, habitualmente deben excluirse (1) el error analítico, chequeando el control de calidad interno utilizado en la determinación analítica de la muestra, y (2) el posible error preanalítico, (por ejemplo, inversión de valores pico y valle como consecuencia de una confusión de muestra, tiempo de toma de muestra inapropiado, o muestra tomada de alguna vía de infusión usada para administrar el fármaco).

Fármacos Utilizados para Precidir el Funcionamiento de Órganos



Dado que los fármacos no son compuestos pasivos, su metabolismo ha sido utilizado para medir el funcionamiento de un órgano, basándose en que la incapacidad de metabolización es indicativa de una disfunción orgánica. Se ha utilizado el metabolismo de fármacos para determinar la función hepática, asumiendo que la medición cuantitativa de la capacidad del hígado para metabolizar ciertos fármacos puede servir como una estimación de la función hepática. Por ejemplo, una prueba de función hepática utiliza lidocaína, fármaco que es convertido a su metabolito monoetilglicinxilidida (MEGX), por medio del sistema citocromo P-450 presente en hígado. Una prueba dinámica de función hepática ha sido diseñada^{ref(2114)} basándose en la medición de MEGX en suero, antes y 15 o 30 minutos después de la administración de un bolo estandarizado de lidocaína (1 mg/kg de peso corporal inyectado durante dos minutos). La pérdida de la habilidad para metabolizar el fármaco, como así también una disminución del flujo sanguíneo hepático funcional, provocan una disminución en la producción de MEGX. Como este metabolito puede ser rápidamente medido, la prueba de MEGX es particularmente valiosa en el campo del trasplante hepático,^{refs(2115)} y en la evaluación de función hepática en niños con enfermedad hepática crónica.^{ref(2116)} Además, dada la versatilidad de esta prueba, su empleo está siendo intensamente estudiado para monitorear función hepática en otras enfermedades.^{refs(2117)}

Perspectivas Futuras

El número de fármacos que debe monitorearse para optimizar la terapia continúa en crecimiento a medida que nuevos agentes son aprobados para uso clínico en seres humanos. El monitoreo es esencial para aquellas medicaciones con índices terapéuticos bajos. Para monitorear dichos fármacos serán necesarios recursos adicionales. El beneficio terapéutico será mayor en aquellas situaciones clínicas en las que sea posible medir nivel del fármaco libre en lugar de nivel del fármaco total.^{refs(2118)} Serán requeridos análisis más específicos para el monitoreo de los enantiómeros del fármaco, en vez de las mezclas racémicas que se miden actualmente.^{ref(2119)} Los anticuerpos monoclonales utilizados con fines terapéuticos también son candidatos potenciales para el monitoreo de sus concentraciones en suero. Finalmente, la individualización de la terapia basada en el conocimiento de la farmacogenética del paciente jugará un papel importante en el monitoreo de fármacos.

Métodos de Análisis

Fármacos anticonvulsivantes

PAUL SALM

PAUL J. TAYLOR

JULIA M. POTTER

Principios del análisis y uso corriente.

La mayoría de los fármacos anticonvulsivantes tienen características específicas en el espectro ultravioleta que fueron explotadas en los intentos iniciales para monitorear los niveles



terapéuticos de estos fármacos.[ref\(2120\)](#) Por ejemplo, después de su extracción y separación por cromatografía de capa delgada, la cuantificación se hacía examinando mediante un barrido la placa a la luz ultravioleta, o eluyendo el fármaco de la placa y registrando su absorción ultravioleta.[ref\(2121\)](#)

Durante muchos años, las técnicas de cromatografía gaseosa (GC) fueron las más importantes para el análisis de estos compuestos en fluidos biológicos. (Ver Tabla 56-2, método 1).[ref\(2122\)](#) Los métodos de cuantificación más comúnmente usados eran los sistemas de detección por ionización de llama (FID) o el más sensible, por nitrógeno selectivo (NSD). Aproximadamente la mitad de los métodos de CG no requieren transformación de los fármacos anticonvulsivantes.[ref\(2123\)](#) pero, en aquellos procedimientos que utilizan la transformación de la muestra, la metilación es el método más comúnmente empleado. Las columnas capilares de sílica fundida son las preferidas debido a su estabilidad a altas temperaturas y a su calidad de inertes, lo cual no sólo elimina la necesidad de transformación, sino que además ofrece mayor selectividad, sensibilidad y velocidad.[ref\(2124\)](#)

Los métodos de HPLC, Cromatografía Líquida de Alta Resolución, (Tabla 56-2, método 2), requieren la purificación del fármaco antes del análisis, ya sea por extracción con solventes orgánicos o por precipitación con proteínas. Casi todos los métodos utilizan cromatografía en fase reversa con detección por absorción ultravioleta.[refs\(2125\)](#)

Los procedimientos inmunológicos (Tabla 56-2, métodos 3 a – 3 h) desarrollados para la medición de anticonvulsivantes incluyen radioinmunoensayo (RIA), inmunoensayo enzimático (IEE), inmunoensayo enzimático fluorométrico (IEFE), inmunoensayo fluorescente (IEF), inmunoensayo de polarización fluorescente (IEPF), inmunoensayo de inhibición nefelométrico (NIA), inmunoensayo de enzima donante clonada (IDEC), e inmunoensayo de multicapa de película seca (IMPS).

La introducción de la técnica de inmunoensayo enzimático (EMIT, Syva Co., Inc., Palo Alto, CA 94303) en los años 1970s hizo posible el monitoreo de rutina para todos los fármacos anticonvulsivantes (Tabla 56-2, método 3b). Este inmunoensayo enzimático homogéneo está basado en la técnica de unión competitiva a proteína, con una enzima como marca y un anticuerpo como proteína de unión (ver capítulo 13). Este es el segundo método más frecuentemente utilizado de acuerdo a los programas sobre monitoreo de fármacos terapéuticos llevados a cabo por el C.A.P. en 1995.

El inmunoensayo enzimático fluorométrico (FEIA, Baxter Diagnostics Inc., Deerfield, IL 60015) es un método de unión competitiva que está basado en el principio de inmunoensayo de partición radial, el cual combina la técnica inmunológica en fase sólida y la cromatografía radial (Tabla 56-2, método 3c). En IEFE, el fármaco de interés presente en la muestra clínica se premezcla con el conjugado de enzima marcada y se coloca en un papel de filtro de fibra de vidrio que contiene al anticuerpo inmovilizado. El fármaco y el fármaco marcado compiten por los sitios de unión del anticuerpo. Después de un adecuado período de incubación, la marca no unida es removida del centro de la zona de reacción a través de una elución radial cuando se aplica una solución de lavado. Esta solución también contiene el sustrato para la enzima e inicia la actividad enzimática simultáneamente con el lavado. La actividad enzimática de la fracción unida en el centro de la zona de reacción es cuantificada por fluorescencia de superficie frontal, y es inversamente proporcional a la concentración del fármaco presente en la muestra.[ref\(2126\)](#) La automatización de esta tecnología requiere



equipamiento especializado y sólo es utilizada por pocos laboratorios.

El inmunoensayo de polarización fluorescente (IEPF) está basado en el principio de unión competitiva y mide la unión del fármaco marcada con fluoresceína directamente por polarización fluorescente (ver Tabla 56-2, método 3d, y capítulo 13 para una descripción más detallada). El método IEPF puede ser altamente automatizado y proporciona resultados muy precisos.[ref\(2127\)](#) Se ha convertido en el procedimiento más ampliamente utilizado, de acuerdo a los datos obtenidos a partir de diferentes programas de monitoreo de fármacos terapéuticos.

El Ames Seralyser tiene métodos para la dosificación de fenitoína y fenobarbital que emplean un ensayo de grupo prostético marcado[ref\(2128\)](#) (ver Tabla 56-2, método 3e, y capítulo 13 para una descripción más detallada). Este ensayo también se usa en consultorios médicos, según técnicas de pruebas en el sitio de atención.

Un inmunoensayo nefelométrico cinético de inhibición es el procedimiento empleado por el Immunochemistry Systems (ICS) de Beckman Instruments, Inc. (Fullerton, CA 92634) (Tabla 56-2, método 3f). En este ensayo el fármaco anticonvulsivante está unido en forma covalente a una proteína. El fármaco de la muestra del paciente compete con el fármaco unido a proteína por la unión a un anticuerpo. La velocidad de cambio de la dispersión de la luz está inversamente relacionada a la concentración del fármaco.[ref\(2129\)](#) Este método sólo es utilizado por un pequeño número de laboratorios.

Una técnica de inmunoensayo homogéneo, inmunoensayo de enzima donante clonada (CEDIA, Microgenics Corporation, Concord, CA 94520) utiliza fragmentos de enzima Beta-galactosidasa obtenidos por ingeniería genética (Tabla 56-2, método 3g).[ref\(2130\)](#) La automatización de esta tecnología puede efectuarse en muchos analizadores de rutina de química clínica.

El sistema OPUS de inmunoensayo (PB Diagnostic Systems Westwood, MA 02090) está basado en la combinación de la tecnología de película multicapa y el inmunoensayo competitivo (Tabla 56-2, método 3h).[ref\(2131\)](#) Un chip recubierto por una película de múltiple capa es encasillado en un módulo plástico de prueba. Se aplica la muestra de suero a la capa superior del módulo de prueba. Esta capa contiene componentes amortiguadores, surfactantes, y otros reactivos (tales como el anticuerpo y el fármaco hapteno marcado), y también actúa como un filtro para prevenir la interferencia de la proteína con la inmunorreacción. La muestra difunde desde la capa superior recubierta a través de un tamiz de óxido de hierro hacia la capa de señal. El óxido de hierro sirve para bloquear la excitación de la marca fuera de la capa de señal. La capa de señal contiene fármaco con marca fluorescente unida a un anticuerpo monoclonal específico para el fármaco a ensayar. El antígeno de la muestra desplaza al antígeno marcado de los sitios de unión de los anticuerpos. El antígeno marcado no unido luego difunde a las capas superiores donde no puede ser medido. El equilibrio ocurre entre 3 a 5 minutos, después de los cuales la señal fluorescente del conjugado remanente es medida desde el fondo del módulo de prueba por fluorometría de superficie frontal. La intensidad fluorescente medida es inversamente proporcional a la concentración de antígeno en la muestra de suero.

Especimen.

La muestra habitual es suero, aunque los tubos separadores de suero no son recomendables porque pueden adsorber fármaco y dar por lo tanto resultados no confiables.



Rango terapéutico.

Los rangos terapéuticos generalmente aceptados para la mayoría de los fármacos anticonvulsivantes que están supeditados al monitoreo de fármacos terapéuticos son los siguientes:

	mg/L	μmol/L
Carbamacepina	4 - 12	17 - 51
Etosuccimida	40 - 100	280 - 460
Fenitoína	10 - 20	40 - 80
Fenobarbital	15 - 30	65 - 170
Primidona	5 - 12	23 - 55
Valproato	50 - 100	350 - 700

Ciclosporina A

LESTER SHAW

Fundamentos del análisis

La dosificación de ciclosporina A (CsA) se efectúa por una de dos técnicas: cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) e inmunoensayo. Todos los procedimientos de inmunoensayo disponibles han mostrado buena correlación con HPLC. Sin embargo, tanto el fármaco padre, ciclosporina A, como sus metabolitos están presentes en la sangre. Los inmunoensayos detectan los metabolitos por reacción cruzada con la CsA. Por lo tanto, se reportan concentraciones mayores de ciclosporina A por métodos de inmunoensayos que por métodos de HPLC. Por ejemplo, se ha reportado que los inmunoensayos que utilizan anticuerpos policlonales sobreestiman las concentraciones de CsA entre un 51% y 132% cuando se comparan con HPLC.[ref\(2132\)](#) Los nuevos inmunoensayos que utilizan anticuerpos monoclonales de alguna manera han mejorado la especificidad, siendo las concentraciones medidas de CsA sólo de 8% a 48% mayores que por HPLC.[ref\(2133\)](#)

Han sido desarrollados varios métodos de HPLC para la dosificación de CsA en sangre entera o plasma (Tabla 56-3, método 1). Las diferencias entre estos métodos incluyen el uso de condiciones de elución isocrática o en gradiente, y la elección del solvente usado para la extracción de la CsA. La extracción de CsA ya sea con éter etílico o metil butílico produce una eficiencia de extracción de aproximadamente el 90%. Aunque los métodos de HPLC tienen la mayor especificidad y exactitud, y continúan siendo el método de referencia, los inmunoensayos han reemplazado ampliamente al HPLC como método de elección. Las diferencias entre las concentraciones de ciclosporina A medidas por HPLC y los varios procedimientos de inmunoensayo parecen ser menos significativas en pacientes con transplantes renales y más significativas en pacientes con enfermedad hepática o transplantes hepáticos.[ref\(2134\)](#) Este perfil es consistente con la inactivación de la ciclosporina A por el metabolismo hepático.[ref\(2135\)](#)

Las técnicas de radioinmunoensayo (RIA) (Tabla 56-3, método 2) fueron los procedimientos originales de inmunoensayo usados para medir CsA; desde entonces han sido



desarrollados radioinmunoensayos monoclonales y policlonales. La resolución analítica de los procedimientos de RIA es similar a la de los procedimientos que no son RIA. Las desventajas de los procedimientos de RIA, tales como la manipulación y el desecho de los compuestos marcados radioactivamente, sumados al largo tiempo de ensayo (6-8 horas), han llevado al incremento del uso de técnicas de inmunoensayo que emplean un marcaje no radioactiva.

El inmunoensayo más popular normalmente usado para CsA es el inmunoensayo de polarización fluorescente (FPIA; Abbott Diagnostics Inc., Abbott Park, Illinois), [ref\(2136\)](#) que es un procedimiento automatizado que proporciona un rápido informe del resultado (Tabla 56-3, método 3). Originalmente se introdujo utilizando un anticuerpo policlonal, pero desde entonces, el método ha sido actualizado con el uso de un anticuerpo monoclonal más selectivo para la CsA droga madre. El ensayo requiere un pretratamiento de la muestra de sangre entera antes de su análisis.

Ha sido introducido recientemente un inmunoensayo enzimático homogéneo (EMIT; Syva Inc., Palo Alto, California) (Tabla 56-3, método 4). De todos los inmunoensayos para CsA, el procedimiento de EMIT exhibe la mayor especificidad por el fármaco padre. [refs\(2137\)](#) Aunque el resto del ensayo es automatizado, este procedimiento también requiere, al igual que IEPF, un paso de pretratamiento de la muestra para lisar los glóbulos rojos, solubilizar la CsA, y precipitar las proteínas de la sangre.

Especimen

Suero, plasma y sangre entera han sido utilizados para la determinación de la concentración de CsA. En sangre entera a 37 °C, la CsA se halla predominantemente en eritrocitos (57%) y en leucocitos (15%). [ref\(2138\)](#) Sin embargo, ocurre una redistribución de la CsA del plasma hacia las células a medida que la temperatura de la muestra decrece. Por lo tanto, varios factores han conducido a la aceptación general de sangre entera como muestra de elección: (1) No hay efecto alguno de la temperatura sobre el análisis de CsA en sangre entera, (2) el uso de sangre entera elimina los problemas asociados con la separación de la muestra, y (3) el uso de sangre entera resulta en concentraciones medibles de CsA más altas. [refs\(2139\)](#) Sin embargo, desde una perspectiva clínica, no se ha reportado ninguna ventaja entre monitorear CsA en sangre entera versus monitorear CsA en plasma. [ref\(2140\)](#)

Aunque también se ha empleado heparina, el anticoagulante recomendado para las muestras de sangre entera es EDTA. [ref\(2141\)](#) Las muestras para el análisis de CsA pueden conservarse hasta una semana entre 2 °C - 8 °C. Para mayores períodos de conservación las muestras deberán congelarse a - 20 °C. ⁶⁰

Rango terapéutico

El establecimiento de un rango terapéutico para ciclosporina A ha sido difícil porque es pobre la correlación entre las concentraciones sanguíneas y el efecto inmunosupresor. La incidencia de rechazo de órgano es mayor a concentraciones bajas de CsA, mientras que la toxicidad ocurre más frecuentemente a concentraciones altas. En predosis, las concentraciones en sangre entera mayores de 400 µg/L durante la terapia de mantenimiento están asociadas con una alta posibilidad de toxicidad. Algunos rangos recomendados para CsA en sangre entera, medidos por HPLC, en pacientes con trasplante renal, bajo terapia triple del fármaco, son los siguientes: hasta 3 meses después de la cirugía, 150 a 225 µg/L ; después de 3 meses



de la cirugía, 100 a 150 µg/L (ver capítulo 50).

Gentamicina y otros aminoglucósidos

JOSEPH R. DiPERSIO

Fundamentos del análisis

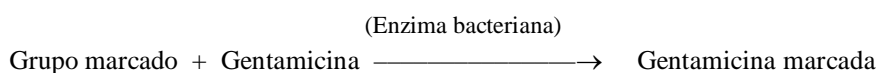
La gentamicina y otros antibióticos aminoglucósidos (estreptomicina, kanamicina, tobramicina, amikacina, y netilmicina) son importantes agentes para el tratamiento de infecciones causadas por bacilos aerobios gram-negativos. El tratamiento con aminoglucósidos es complicado por ser bastante estrecha la ventana terapéutica que existe entre las concentraciones efectivas y tóxicas. Como resultado de esta estrecha ventana terapéutica, es necesario realizar frecuentes mediciones para asegurarse que las concentraciones terapéuticas apropiadas han sido alcanzadas.

Los métodos usados para la medición de gentamicina son también aplicables para la medición de los otros aminoglucósidos. Por lo tanto, la medición de gentamicina sirve como prototipo para el análisis de los demás compuestos.

El método original usado para cuantificar gentamicina fue el ensayo microbiológico que medía actividad biológica. El método de difusión en placa de agar se basaba en la magnitud de la inhibición del crecimiento bacteriano causado por la difusión de antibiótico desde un disco de papel hacia el agar conteniendo una bacteria indicadora de crecimiento. El procedimiento actual agrega estándares de gentamicina y muestras desconocidas a discos de papel en cantidades cuidadosamente medidas. Los discos son luego colocados sobre la superficie de una placa de agar que contiene la bacteria en crecimiento susceptible al antibiótico. La placa se deja incubar aproximadamente de 4 a 18 horas. Los discos de papel conteniendo antibiótico inhibirán el crecimiento bacteriano en un área que circunda los discos de papel. El diámetro de la zona de inhibición de crecimiento bacteriano está directamente relacionado con la concentración de antibiótico inicialmente aplicada sobre el disco de papel. Se traza una curva estándar representando gráficamente en papel semilogarítmico el diámetro de las zonas de inhibición de crecimiento para cada estándar versus la concentración de antibiótico en cada disco. La concentración de antibiótico en la muestra desconocida se determina por interpolación en la curva estándar.

El método en placa de agar tiene varios inconvenientes, incluyendo entre ellos, la presencia de otros fármacos antimicrobianos además de la que está siendo dosificada, y el largo tiempo de análisis. El desarrollo de los inmunoensayos a principios de la década del 70 permitió el análisis rápido y automatizado de los aminoglucósidos y reemplazó a los ensayos microbiológicos.

El primer inmunoensayo usado para medir gentamicina fue el radioinmunoensayo (RIA)^{ref(2142)} (Tabla 56-4, método 1). En este procedimiento, la gentamicina es marcada radioactivamente con una enzima bacteriana que transfiere enzimáticamente un sustrato marcado con radioactivo a la gentamicina:





El RIA no es muy adecuado para análisis de urgencia tipo stat, y además tiene la desventaja del manejo del desecho del material radioactivo. Por ello, se han desarrollado inmunoensayos de unión competitiva que utilizan marcas enzimáticas o fluorescentes, que son los métodos más populares actualmente en uso.

El inmunoensayo de polarización fluorescente (IEPF) es un inmunoensayo homogéneo de unión competitiva que mide el cambio en la fluorescencia polarizada causado por la gentamicina del suero del paciente, que compite con la gentamicina marcada con fluoresceína, por un número limitado de sitios de unión del anticuerpo^{ref(2143)} (Tabla 56-4, método 2). Otro procedimiento de inmunoensayo homogéneo ampliamente utilizado es la técnica de inmunoensayo enzimático múltiple (EMIT, Syva Co., Palo Alto, California) (Tabla 56-4, método 3). Este procedimiento se basa en la unión competitiva al anticuerpo entre la gentamicina marcada con la enzima glucosa-6-fosfato y la gentamicina de la muestra del paciente. La unión de la gentamicina marcada con enzima al anticuerpo produce una pérdida de la actividad enzimática. Por lo tanto, concentraciones crecientes de gentamicina en la muestra del paciente están directamente relacionadas con la actividad enzimática en la mezcla de reacción.

Los procedimientos cromatográficos para aminoglucósidos incluyen cromatografía en placa delgada, cromatografía líquida de alta resolución, y cromatografía de intercambio iónico. Estas técnicas no son generalmente usadas en los laboratorios clínicos para la determinación de aminoglucósidos.

Especimen

Los especímenes de elección para el análisis de aminoglucósidos por cualquiera de los inmunoensayos son el suero o el plasma obtenido con EDTA. La heparina no es recomendada como anticoagulante porque interfiere en el ensayo.^{refs(2144)} Otros tipos de especímenes como el fluido cerebroespinal, líquido sinovial y otros fluidos no viscosos pueden ser usados en el método inmunológico.

Rango Terapéutico

En la Tabla 56-5 se muestran los intervalos de referencia aceptados para los antibióticos aminoglucósidos.

Litio

STEVEN C. KAZMIERCZAK

Principios del análisis y uso corriente

El litio no se une a las proteínas plasmáticas, pasando libremente a través de la membrana glomerular y siendo luego absorbido en el túbulo proximal convoluto. Debido a que el litio tiene un índice terapéutico relativamente restringido, el monitoreo de su concentración en sangre debe ser llevado a cabo en forma rutinaria.

Hasta hace poco tiempo, la determinación de litio en los laboratorios clínicos era realizado por espectrometría de emisión atómica (AES) (Tabla 56-6, método 1) o por espectrometría de absorción atómica (EAA) (Tabla 56-6, método 2). La EAA es el método de referencia para la determinación del litio.^{ref(2145)} Con la introducción del electrodo



ion-selectivo para el litio y más recientemente, un ensayo colorimétrico, el uso de la EAA y AES para la determinación de litio ha declinado considerablemente.

Los principios generales de la AES fueron discutidos en el capítulo 4. La energía térmica de una llama de aire-propano vaporiza las sales de litio para formar átomos de litio libre. El calor también hace que una pequeña fracción de los átomos de litio en estado basal se excite, elevando un electrón del orbital 2s al orbital 2p, de mayor energía. Debido a la inestabilidad del estado excitado, el electrón del orbital 2p vuelve instantáneamente a su orbital original 2s con una emisión concomitante de energía en forma de luz de 671 nm.

La muestra se diluye con una solución que contiene potasio o cesio, que sirve como estándar interno. El potasio o cesio del estándar interno sigue el mismo camino de vaporización, excitación y retorno al estado basal con emisión de luz. La emisión de luz, sin embargo, ocurre a una longitud de onda diferente que para el litio. Midiendo la relación entre la emisión de luz del estándar interno y la del litio se pueden corregir posibles fuentes de error en el análisis. Las fuentes de error pueden ser introducidas por fluctuaciones en la temperatura de la llama, velocidad de aspiración de la muestra, relación de combustible a oxidante y composición de los gases reductores presentes en la llama. Dado que se mide la relación entre la emisión del estándar interno y el litio, las fluctuaciones en la resolución del instrumento que afecten ambos elementos se anularán, y de esta manera el error de medición será minimizado.

La mayoría de los procedimientos actuales de AES utilizan cesio como estándar interno. En contraste con el potasio, el cesio no es detectable en suero o plasma, y por lo tanto no es necesaria ninguna corrección por cesio endógeno. Además, utilizando cesio como estándar interno, pueden analizarse en la misma muestra el sodio, el potasio y el litio.

La EAA no se usa frecuentemente para determinar litio en fluidos corporales. En el capítulo 4 se hace una revisión de la teoría y aplicaciones de la EAA, que es similar a la AES en que los átomos de litio en estado basal son producidos por el calor generado por una llama de acetileno-aire. Los átomos de litio en estado basal absorben luz de 670.8 nm producida por una lámpara de litio de cátodo hueco. La cantidad de luz que es absorbida es proporcional a la cantidad de litio presente en la llama. El sodio y el potasio en concentraciones de hasta 180 y 8 mmol/L, respectivamente, no interfieren en las determinaciones de litio por EAA.[ref\(2146\)](#) Una cantidad muy pequeña de iones de litio se ionizará en estas condiciones y emitirá luz de 670.8 nm en lugar de absorber la luz de 670.8 nm producida por la lámpara de cátodo hueco. Debido a que el litio que se ioniza puede introducir un error en la medición, a veces se incorpora un donante de electrones que suprime la ionización como el cloruro de estaño. Sin embargo, dado que la cantidad de litio que se ioniza es muy pequeña (aproximadamente 1%), el uso de un compuesto que suprima la ionización no es necesario.

El uso de un electrodo ion selectivo (Tabla 56-6, método 3) para la determinación de litio es ahora predominante en los laboratorios clínicos. A diferencia de la EAA y la AES, los instrumentos que incorporan la tecnología del electrodo ion selectivo son automatizados más fácilmente, y necesitan menos tecnología. La membrana ion selectiva incorpora un ionóforo con alta especificidad por el litio. Sin embargo, otros cationes como el sodio, aunque también el potasio, calcio, magnesio y amonio pueden interferir en este método.[ref\(2147\)](#) La mayoría de los instrumentos que incorporan la tecnología del electrodo ion selectivo para las determinaciones de litio corrigen la interferencia del sodio, pero no la de otros cationes. Las concentraciones de litio determinadas usando la tecnología del electrodo ion selectivo pueden



compararse favorablemente con las encontradas usando AES o dilución isotópica/espectrometría de masa.[ref\(2148\)](#)

El método más reciente para la determinación de litio es colorimétrico (Tabla 56-6, método 4), y usa como cromóforo un tipo específico de éter, de los que químicamente forman una corona y de los cuales hay 15 tipos disponibles. La muestra se deposita sobre una placa de reactivo seco donde el litio se une específicamente a un conjugado del éter mencionado. Debido a que el cromóforo es específico para el litio, no se requiere ninguna corrección por interferencia de otros cationes endógenos. La unión del litio al éter provoca un corrimiento de 400 a 600 nm en el pico de absorbancia del cromóforo. El incremento de absorbancia en 600 nm es proporcional a la concentración de litio en la muestra. La comparación entre las determinaciones de litio llevadas a cabo por el método colorimétrico y la técnica de AES reveló una desviación insignificante y una buena correlación entre los resultados.[ref\(2149\)](#)

Especimen

El suero o plasma son especímenes aceptables. Si se usa plasma, los anticoagulantes preferidos son la heparina sódica o amónica. Se han observado interferencias con la tecnología del electrodo ion selectivo cuando se usa plasma anticoagulado con EDTA, oxalato/fluoruro y citrato de sodio.[ref\(2150\)](#) Debe evitarse el uso de heparinato de litio. El litio es completamente absorbido del tracto gastrointestinal dentro de 1 a 2 horas después de la ingestión. Para el monitoreo de rutina, normalmente se toman muestras 8 a 10 horas después de una dosis oral. El suero o plasma debe ser separado de las células si el análisis no se va a llevar a cabo dentro de las 4 horas de la toma de muestra. Una vez separado el suero o plasma, el litio es estable por lo menos 24 horas a temperatura ambiente, 7 días a 4 °C y más de 6 meses a -18 °C.

Rango Terapéutico

Se han reportado concentraciones terapéuticas de litio en suero o plasma en el rango de 0.3 a 1.3 mmol/L, mientras que las concentraciones tóxicas son las superiores a 2.5 mmol/L.[ref\(2151\)](#) Los efectos secundarios asociados con la toxicidad del litio son: vómitos, ataxia, pérdida de conciencia que conduce al coma, rigidez muscular, pirexia suave y cambios en el electroencefalograma.

Las concentraciones de litio dentro de los glóbulos rojos pueden ser determinadas como una guía para estimar las concentraciones de litio dentro de los tejidos y para detectar el incumplimiento de la terapia por parte del paciente, ya que el equilibrio entre el plasma y los glóbulos rojos sólo se establece después de un uso regular.[ref\(2152\)](#) Para pacientes con concentraciones terapéuticas de litio en suero, las concentraciones correspondientes de litio en los glóbulos rojos son de 0.2 a 0.8 mmol/L.[ref\(2153\)](#)

Teofilina y cafeína

SAEED A. JORTAMI

Principios del análisis y uso corriente

La teofilina y la cafeína son agentes farmacológicos que poseen la capacidad de relajar

los músculos lisos de los bronquiolos, llevando a la vasodilatación. Después de la administración, la teofilina es rápida y casi completamente absorbida, alcanzándose el pico de concentración en el plasma a las 2-3 horas. En neonatos, la teofilina es metilada para formar cafeína. La cafeína es tan efectiva como la teofilina para el tratamiento de la apnea en neonatos. Por lo tanto, en los neonatos que reciben teofilina deben monitorearse las concentraciones tanto de teofilina como de cafeína.

Una gran cantidad de técnicas han sido desarrolladas para la determinación de teofilina en suero. Algunos de esos métodos pueden ser también utilizados para la determinación de cafeína.

El primer método de rutina desarrollado para la determinación de teofilina fue espectrofotométrico (Tabla 56-7, método 1). La teofilina del suero se extrae con una mezcla de cloroformo e isopropanol, y luego ésta se reextrae con una solución diluida de hidróxido de sodio. La absorbancia del extracto final se mide en 277 y 310 nm. La concentración del fármaco en la muestra desconocida se determina por interpolación en una curva estándar preparada con calibradores que contienen cantidades conocidas de teofilina. Este método espectrofotométrico es sólo de interés histórico y hoy es raramente usado.

La determinación de teofilina por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Tabla 56-7, método 2) es una técnica aceptable, aunque en la actualidad es muy poco usada. Aunque los métodos por HPLC son menos costosos que otras técnicas, la amplia disponibilidad de métodos inmunológicos para teofilina, que son fácilmente automatizables, limitan su uso. Se han reportado métodos por HPLC que no requieren extracción de la teofilina del suero y pueden realizarse con sólo 10 microlitros de muestra.[ref\(2154\)](#) Sin embargo, se ha encontrado que varios fármacos como la ampicilina, meticilina,[ref\(2155\)](#) cloramfenicol y algunas cefalosporinas[ref\(2156\)](#) interfieren con los métodos por HPLC. La interferencia de estos compuestos puede ser eliminada mediante una etapa de extracción.[ref\(2157\)](#) El acetonitrilo es típicamente usado como fase móvil. La mayoría de los métodos por HPLC usan 8-cloro teofilina u 8-hidroxietil teofilina como estándar interno.[refs\(2158\)](#) La concentración de teofilina es determinada por comparación de la altura o el área del pico del cromatograma producido por el suero de un paciente con el producido por un estándar. Una ventaja importante de este método es que simultáneamente puede ser determinada la cafeína, que eluye en un pico separado. HPLC es un procedimiento usado comúnmente para la determinación de cafeína en neonatos.

Otro método cromatográfico para la determinación de teofilina es la cromatografía gas-líquido (GLC). Debido a la complejidad y al tiempo requerido para el análisis de teofilina, este método es muy poco usado en el laboratorio clínico.

Una técnica muy exacta para la determinación de teofilina es la cromatografía gaseosa con espectrometría de masa (GC/MS). Este método ha sido recomendado como método de referencia para la teofilina.[ref\(2159\)](#) Al suero del paciente se agrega un estándar interno marcado radiactivamente, [^{15}N , $2\text{-}^{13}\text{C}$] teofilina, y luego la teofilina marcada y la teofilina presente en el suero del paciente se extraen con una mezcla de cloroformo-isopropanol (pH 5,2). Luego, el estándar interno y la teofilina se conjugan por incubación del residuo extraído con iodopentano, y la cromatografía gaseosa se utiliza para separar la teofilina de otros compuestos similares. Se utiliza un detector de masa para monitorear el perfil espectral de los iones de la teofilina y del estándar interno a m/z (relación de masa a carga) 250 y 253



respectivamente. Las relaciones de estos iones son luego comparadas contra estándares de concentración conocida de teofilina, y la concentración de teofilina en la muestra del paciente se calcula a partir de la curva estándar.

La técnica más comúnmente usada para la determinación de teofilina es el inmunoensayo por polarización de fluorescencia IEPF (Tabla 56-7, método 3). En este método, la teofilina marcada con fluoresceína compite por una cantidad limitada de anticuerpo con la teofilina presente en la muestra del paciente.^{ref(2160)} La teofilina marcada con fluoresceína unida al anticuerpo es una molécula mucho más grande que el fluoróforo solo y, como resultado, rota mucho más lentamente que el fluoróforo no unido. Un haz de luz polarizada que incide sobre el complejo anticuerpo-teofilina marcada excitará el fluoróforo fluoresceína. La fluorescencia emitida por el complejo será mucho más polarizada que la emitida por el fluoróforo no unido. Entonces la intensidad de la fluorescencia polarizada emitida es inversamente proporcional a la concentración de teofilina en el suero del paciente.

Otro método popular de inmunoensayo para teofilina es un inmunoensayo enzimático homogéneo (EMIT) (Tabla 56-7, método 4). Esta técnica utiliza un formato de unión competitiva donde la teofilina marcada con la enzima glucosa 6 fosfato dehidrogenasa (G-6-PD) compite con la teofilina presente en el suero del paciente por la unión a un anticuerpo específico para teofilina. Cuando la teofilina marcada con G-6-PD se une al anticuerpo anti-teofilina, el complejo resultante causa una reducción en la actividad de G-6-PD. La actividad enzimática remanente después de un determinado período de incubación es proporcional a la concentración de teofilina en el suero del paciente. La cantidad remanente de G-6-PD enzimáticamente activa después del período de incubación se mide espectrofotométricamente a 340 nm por monitoreo de la velocidad de formación de NADH. Una técnica similar ha sido desarrollada para la determinación de cafeína en suero.

Otro método inmunoenzimático ampliamente usado para la medición de teofilina es una técnica inmunoenzimofluorométrica basada en la unión competitiva entre teofilina marcada con una enzima y la teofilina presente en el suero del paciente por la unión a un anticuerpo anti-teofilina conjugado sobre la superficie de un papel de fibra de vidrio. La enzima marcadora usada comúnmente en la fosfatasa alcalina bacteriana (FAL). Después que se estableció el equilibrio para la unión de la teofilina marcada y no marcada al anticuerpo, los complejos teofilina-anticuerpo no unidos son lavados, y se agrega el sustrato fosfato de 4-metil umbeliferona, que es convertido en un producto fluorescente por la FAL presente en los complejos teofilina-enzima-anticuerpo. Cuando en el suero del paciente no hay o hay una cantidad muy pequeña de teofilina, una cantidad máxima de complejo teofilina-enzima se unirá al anticuerpo inmovilizado, resultando en una producción máxima de producto fluorescente.

Un procedimiento de inmunoensayo relativamente nuevo que utiliza la tecnología del DNA recombinante es el ensayo IDEC para teofilina (Microgenics Corp., Concord, CA 94520) (Tabla 56-7, método 5). En este ensayo, la enzima beta-galactosidasa es sintetizada como 2 fragmentos separados; un fragmento diseñado como porción dadora de enzima (ED) y el otro diseñado como porción receptora de enzima (ER). La teofilina es unida covalentemente a la porción ED de la enzima.^{ref(2161)} La asociación de ED y ER resulta en la formación de beta-galactosidasa enzimáticamente activa. El agregado de un anticuerpo anti-teofilina al sistema de reactivos inhibirá la asociación de los fragmentos ED y ER para formar la enzima activa. La competencia por la teofilina presente en el suero del paciente creará enzima activa en proporción directa a la concentración de teofilina en el suero. La



cantidad de enzima creada es monitoreada a través de la hidrólisis de un sustrato como el rojo de clorofenol- β -D-galactopiranosido.[ref\(2162\)](#)

Se han desarrollado métodos automatizados para teofilina que pueden utilizar suero, plasma o sangre total, basados en un inmunoensayo de inhibición enzimática[ref\(2163\)](#) (Tabla 56-7, método 6). En este procedimiento, la teofilina está conjugada a un inhibidor de la enzima acetilcolinesterasa. La teofilina presente en el suero del paciente compite con el conjugado teofilina-inhibidor por la unión al anticuerpo anti-teofilina. La unión del anticuerpo al complejo inhibidor impide que el inhibidor se una a la enzima, resultando en una actividad enzimática aumentada. Entonces, la concentración de teofilina en la muestra del paciente es inversamente proporcional a la cantidad de enzima activa remanente. La actividad de acetilcolinesterasa se monitorea usando el sustrato yoduro de acetil- β -metil-tiocolina, que es hidrolizado por la enzima para producir tioles libres. Los tioles libres formados reaccionan con ácido 5,5' ditiobis(2-nitrobenzoico) para formar tionitrobenzoato, que puede ser medido espectrofotométricamente.

En algunos laboratorios clínicos se utiliza un ensayo inmunonefelométrico para cuantificar la teofilina en el suero (Tabla 56-7, método 7).[ref\(2164\)](#) En este procedimiento, la teofilina está conjugada a una proteína de alto peso molecular. La teofilina presente en el suero del paciente compite con el conjugado proteína-teofilina por la unión a un anticuerpo anti-teofilina. La unión del conjugado proteína-teofilina al anticuerpo resulta en la formación de un complejo insoluble, que precipita y causa dispersión de la luz. La unión de teofilina soluble, presente en el suero del paciente, al anticuerpo no resulta en dispersión de la luz. La velocidad de incremento de dispersión de la luz es inversamente proporcional a la concentración de teofilina en el suero del paciente, y es monitoreada mediante un nefelómetro.

Un método para la determinación de teofilina que es análogo al ensayo de inhibición inmunonefelométrico antes descrito, es el inmunoensayo de inhibición turbidimétrico con partículas mejoradas (PETINIA) (Tabla 56-7, método 8). En este procedimiento, la teofilina unida covalentemente a partículas de látex compite con la teofilina presente en el suero del paciente por los sitios de unión de un anticuerpo específico. La unión del complejo teofilina-látex al anticuerpo resulta en la formación de agregados que provocan un aumento de la turbidez de la solución. La velocidad de formación de estos agregados puede ser monitoreada espectrofotométricamente a 340 nm y es inversamente proporcional a la concentración de teofilina en el suero del paciente.

Un novedosa aproximación para la determinación de teofilina utiliza un procedimiento de película delgada (Johnson y Johnson, Rochester, NY 14650) (Tabla 56-7, método 9). Este ensayo se basa en que la teofilina es un inhibidor de la fosfatasa alcalina (FAL) obtenida de hígado vacuno. La enzima y un sustrato adecuado son incorporados al sistema reactivo en placa. La aplicación de suero de pacientes conteniendo teofilina a la placa resulta en una inhibición de la actividad enzimática proporcional a la concentración de teofilina en la muestra. En ausencia de teofilina la conversión de sustrato en producto por la FAL ocurre a velocidad máxima.

Otra técnica que utiliza el formato de película seca para la determinación de teofilina hace uso de la competencia entre la teofilina y un complejo teofilina-enzima-grupo prostético por la unión a un anticuerpo (Bayer Inc., Tarrytown, New York) (Tabla 56-7, método 10).[ref\(2165\)](#) En este procedimiento, la enzima glucosa oxidasa sin su grupo prostético es

incorporada en un film seco junto con un sustrato adecuado. La glucosa oxidasa requiere que su grupo prostético (flavina adenina dinucleótido, FAD) esté unido para ser activa. La FAD, que ha sido unida covalentemente a la teofilina, forma parte del reactivo además de un anticuerpo específico para la teofilina. La aplicación al sistema del suero de un paciente que contenga teofilina resulta en una competición entre los complejos teofilina-FAD y la teofilina contenida en el suero del paciente por la unión al anticuerpo. Cuanto mayor sea la cantidad de teofilina presente en el suero, menos probable será que los complejos teofilina-FAD puedan unirse al anticuerpo y entonces estarán disponibles para combinarse con la enzima para formar un complejo activo enzima-grupo prostético. Si no hay teofilina en el suero del paciente, se formará una cantidad máxima de complejo anticuerpo-teofilina-FAD, y la cantidad de teofilina-FAD remanente que puede unirse a la enzima para dar un complejo activo será mínima. La cantidad de glucosa oxidasa enzimáticamente activa es monitoreada por la conversión de glucosa y oxígeno a gluconolactona y agua oxigenada. Una peroxidasa usa el agua oxigenada generada para oxidar el sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbenceno y formar un cromógeno coloreado que puede ser monitoreado a 740 nm.

Especimen

Para la mayoría de los análisis mencionados puede utilizarse suero o plasma heparinizado. Para aquellos métodos que pueden usar sangre entera, cuando se interpretan los resultados debe tenerse en cuenta el tipo de muestra utilizada, ya que la sangre entera tiene sólo el 82% de la concentración de teofilina del suero o plasma. La saliva puede ser también usada como muestra cuando se emplean HPLC o IEPF como métodos de análisis.[refs\(2166\)](#) La saliva se colecta mientras el paciente masca parafina y la muestra es luego centrifugada para eliminar el sedimento.

Rango terapéutico

El rango terapéutico para la teofilina en suero y plasma de niños y adultos es de 8 a 20 µg/mL (44 a 111 µmol/L).[refs\(2167\)](#) Para el tratamiento de la apnea en neonatos el rango terapéutico para la teofilina es de 6 a 11 µg/mL (33-61 µmol/L).[refs\(2168\)](#) Las concentraciones terapéuticas de cafeína en esos mismos individuos son de 5 a 20 µg/mL, y puede causar dolores de cabeza, hipotensión, náuseas, insomnio, convulsiones y taquicardia.[refs\(2169\)](#) Las concentraciones de cafeína superiores a 30 µg/mL pueden producir síntomas como insomnio, delirio, taquicardia, tensión muscular y temblores.

Referencias

1. Ritschel WA: *Handbook of basic pharmacokinetics including clinical applications*, Hamilton, Ill., 1986, Drug Intelligence Publications.
2. Borga O, Azarnoff DL, Plym Forshell G, Sj`qvist F: Plasma protein binding of tricyclic antidepressants in man, *Biochem Pharmacol* 18:2135-2143, 1969.
3. Reidenberg MM, Odar-Cederlof I, von Bahr C, et al: Protein binding from diphenylhydantoin and desmethylinipramine in plasma from patients with poor renal function, *N Engl J Med* 285:264-267, 1971.
4. Levy G: Relationship between pharmacological effects and plasma or tissue concentrations of drugs in man.



- In Davies DS, Pritchard DNC, editors: *Biological effects of drugs in relation to their plasma concentrations*, Baltimore, 1973, University Park Press.
5. Stewart RB, Forgnone M, Cluff LE: Drug utilization and reported adverse drug reactions in outpatients, *Drugs in Health Care* 2:231-243, 1975.
 6. Ritschel WA: Pharmacokinetics of H₂-receptor antagonists, *Sci Pharm* 50:250-259, 1982.
 7. Barker KN, McConnell WE: How to detect medication errors, *Mod Hosp* 99:95-106, 1962.
 8. Stewart RB, Cluff LE: A review of medication errors and compliance in ambulant patients, *Clin Pharmacol Ther* 13:463-468, 1971.
 9. Bochner F, Carruthers G, Kampmann J, Stiner J: *Handbook of clinical pharmacology*, Boston, 1978, Little, Brown & Co, pp 22-25.
 10. Ritschel WA: The effect of aging on pharmacokinetics: a scientists' view of the future, *Contemp Pharmacy Pract* 5:209-218, 1982.
 11. Hassan FM, Pesce AJ, Ritschel WA: Pitfalls and errors in drug monitoring: analytical aspects, *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 5:567-573, 1983.
 12. Slaughter RL, Koup JR: Clinical pharmacokinetic service. In McLeod DD, Miller WA, editors: *The practice of pharmacy*, Cincinnati, 1981, Harvey Whitney Books.
 13. Ritschel WA: *Handbook of basic pharmacokinetics*, ed 2, Hamilton, Ill., 1980, Drug Intelligence Publications, pp 412-427.
 14. Evans WW, Schentag JJ, Jusko WJ: *Applied pharmacokinetics: principles of therapeutic drug monitoring*, Vancouver, Wash., 1994, Applied Therapeutics, Inc.
 15. Holt DW, Johnston A, Roberts NB, et al: Methodological and clinical aspects of cyclosporin monitoring: report of the Association of Clinical Biochemists task force, *Ann Clin Biochem*, 31:420-446, 1994.
 16. Oellerich M, Armstrong VW, Kahan BD, Shaw L, Holt DW, Yatscoff R, Lindholm A, Halloran P, Gallicano K, Wonigeit K, Schhtz E, Schran H, Annesley T: Lake Louise Consensus Conference on Cyclosporin Monitoring in Organ Transplantation: Report of the Consensus Panel, *Ther Drug Monit*, 1995. (In press.)
 17. Matzuk MM, Shlomchik M, Shaw LM: Making digoxin therapeutic drug monitoring more effective, *Ther Drug Monit* 13:215-219, 1991.
 18. Edson RS, Terrell CL: The aminoglycosides, *Mayo Clin Proc* 66:1158-1164, 1991.
 19. Barclay ML, Begg EJ, Hickling KG: What is the evidence for once-daily aminoglycoside therapy? *Clin Pharmacokinet* 27:32-48, 1994.
 20. Blaser J, Konig C, Simmen HP, Thurnheer U: Monitoring serum concentrations for once-daily netilmicin dosing regimens, *J Antimicrob Chemother* 33:341-348, 1994.
 21. Sawchuk RJ, Zaske DE, Cipolle RJ, et al: Kinetic model for gentamicin dosing with the use of individual patient parameters, *Clin Pharmacol Therap* 21:362-369, 1977.
 22. Sheiner LB, Rosenberg B, Melmon K: Modelling of individual pharmacokinetics for computer-aided dosage, *Computer Biomed Res* 5:441-459, 1972.
 23. Yuen GJ, Taylor JW, Ludden TM, Murphy MJ: Predicting phenytoin dosage using Bayesian feedback: a comparison with other methods, *Ther Drug Monit* 5:437-441, 1983.
 24. Böttger H-Ch, Oellerich M, Sybrecht GW: Use of aminoglycosides in critically ill patients: individualisation of dosage using Bayesian statistics and pharmacokinetic principles, *Ther Drug Monit* 10:280-286, 1988.
 25. Hurley SF, McNeil JJ: A comparison of the accuracy of a least squares regression, a Bayesian, Chiou's and the steady-state clearance method of individualising theophylline dosage, *Clin Pharmacokinet* 14:311-320, 1988.
 26. Pryka RD, Rodvold KA, Garrison M, Rotschafer JC: Individualizing vancomycin dosage regimens: one-versus two-compartment Bayesian models, *Ther Drug Monit* 11:450-454, 1989.
 27. Destache CJ, Meyer SK, Bittner MJ, Mermann KG: Impact of a clinical pharmacokinetic service on patients treated with aminoglycosides: a cost-benefit analysis, *Ther Drug Monit* 12:419-426, 1990.



28. Destache CJ, Meyer SK, Rowley KM: Does accepting pharmacokinetic recommendations impact hospitalization? A cost-benefit analysis, *Ther Drug Monit* 12:427-433, 1990.
29. Bennet MJ, Carpenter KH, Worthy E, Lilleyman JS: Cyclosporin concentrations in whole blood and plasma, *Clin Chem* 30:817, 1984.
30. Fraser CG: Desirable standards of performance for therapeutic drug monitoring, *Clin Chem* 33:387-389, 1987.
31. Jenny RW: Analytical goals for determinations of theophylline concentration in serum, *Clin Chem* 37:154-158, 1991.
32. Oellerich M, Raude E, Burdelski M, et al: Monoethylglycinexylidide formation kinetics: a novel approach to assessment of liver function. *J Clin Chem Clin Biochem* 25:845-853, 1987.
33. Oellerich M, Burdelski M, Ringe B, et al: Lignocaine metabolite formation as a measure of pre-transplant liver function, *Lancet* 1:640-642, 1989.
34. Adam R, Azoulay D, Astarcioglu I, et al: Reliability of the MEGX test in the selection of liver grafts, *Transplant Proc* 23:2470-2471, 1991.
35. Oellerich M, Burdelski M, Lautz HU, et al: Predictors of one-year pretransplant survival in patients with cirrhosis, *Hepatology* 14:1029-1034, 1991.
36. Gremse DA, A-Kader HH, Schroeder TJ, Balisteri WF: Assessment of lidocaine metabolite formation as a quantitative liver function test in children, *Hepatology* 12:565-569, 1990.
37. Schroeder TJ, Gremse DA, Mansour ME, et al: Lidocaine metabolism as an index of liver function in hepatic transplant donors and recipients, *Transplant Proc* 21:2299-2301, 1989.
38. Lehmann U, Armstrong VW, Schltz E, et al: Monoethylglycinexylidide as an early predictor of posttraumatic organ failure, *Ther Drug Monit* 17:125-132, 1995.
39. Oellerich M, Mhller-Vahl H: The EMIT FreeLevel ultrafiltration technique compared with equilibrium dialysis and ultracentrifugation to determine protein binding of phenytoin, *Clin Pharmacokinet* 9(suppl 1):61-70, 1984.
40. Zielmann S, Mielck F, Kahl R, et al: A rational basis for the measurement of free phenytoin concentration in critically ill trauma patients, *Ther Drug Monit* 16:139-144, 1994.
41. Williams KM: Molecular asymmetry and its pharmacological consequences, *Adv Pharmacol* 22:57-122, 1991.
42. Svensmark O, Kristensen P: Determination of diphenylhydantoin and phenobarbital in small amounts of serum, *J Lab Clin Med* 61:501-507, 1963.
43. Pippenger CE, Scott JE, Gillen HW: Thin-layer chromatography of anticonvulsant drugs, *Clin Chem* 15:255-260, 1969.
44. Rambeck B, Meijer JWA: Gas chromatographic methods for the determination of antiepileptic drugs: a systematic review, *Ther Drug Monit* 2:385-396, 1980.
45. Plotczyk LL: Application of fused-silica capillary gas chromatography to the analysis of underivatized drugs, *J Chromatogr* 240:349-360, 1982.
46. Volmut J, Matisova E, Pham Thi Ha: Simultaneous determination of six antiepileptic drugs by capillary gas chromatography, *J Chromatogr* 547:428-435, 1990.
47. Meatherall R, Ford D: Isocratic liquid chromatographic determination of theophylline, acetaminophen, chloramphenicol, caffeine, anticonvulsants, and barbiturates in serum, *Ther Drug Monit* 10:101-115, 1988.
48. Ou CN, Rognerud CL: Simultaneous measurement of ethosuximide, primidone, phenobarbital, phenytoin, carbamazepine, and their bioactive metabolites by liquid chromatography, *Clin Chem* 30:1667-1670, 1984.
49. Price CP, Newman DJ, editors: Radial partition immunoassay. In *Principles and practice of immunoassay*, New York, 1991, Stockton Press.
50. Frings CS, Phillips G: Therapeutic drug monitoring of anticonvulsant drugs using fluorescence polarization immunoassay, *Clin Chem* 28:1611, 1982.



51. Tybach R: Adaptation of prosthetic-group label homogeneous immunoassay to reagent strip format, *Clin Chem* 27:1499-1504, 1981.
52. Nishikawa T, Kubo H, Saito M: Competitive nephelometric immunoassay method for antiepileptic drugs in patient blood, *J Immunol Methods* 29:85-89, 1979.
53. Engel WD, Khanna PL: CEDIA in vitro diagnostics with a novel homogeneous immunoassay technique, *J Immunol Methods* 150:99-102, 1992.
54. Jandreski MA, Shah JC, Gardincius J, Bermes EW Jr: Clinical evaluation of five therapeutic drugs using dry film multilayer technology on the OPUS immunoassay system, *J Clin Lab Anal* 5:415-421, 1991.
55. Blick KE, Melouk SH, Fry HD, Gillum RL: *Clin Chem* 36:670-674, 1990.
56. Tredger JM, Gonde CE, Williams R: Monitoring cyclosporine in liver-transplant recipients: effects of clinical status on the performance of two monoclonal antibody-based methods, *Clin Chem* 38:108-113, 1992.
57. Chou D: Therapeutic drug monitoring (immunosuppressive drugs), *Anal Chem* 65:412R-415R, 1993.
58. Yatscoff RW, Copeland KR, Faraci CJ: Abbott TDx monoclonal antibody assay evaluated for measuring cyclosporin in whole blood, *Clin Chem* 36:1969-1973, 1990.
59. Sketris I, Yatscoff R, Keown P, et al: Optimizing the use of cyclosporin in renal transplantation, *Clin Biochem* 28:195-211, 1995.
60. Lemaire M, Tillement JP: Role of lipoproteins and erythrocytes in the in vitro binding and distribution of cyclosporin A in the blood, *J Pharm Pharmacol* 34:715, 1982.
61. Shaw LM, Bowers L, Demers L, et al: Critical issues in cyclosporine monitoring: report of the task force on cyclosporine monitoring, *Clin Chem* 33:1269-1288, 1987.
62. Lewis JE, Nelson JC, Wilson TN: Radioimmunoassay of an antibiotic: gentamicin, *Nature (New Biol)* 239:214, 1972.
63. Dandiker WB: Investigation of immunochemical reactions by fluorescence polarization. In Atassi MA, editor: *Immunochemistry of proteins*, New York, 1977, Plenum Publishing.
64. Bastiani RJ: The EMIT system: a commercially successful innovation, *Antibiot Chemother* 26:89, 1979.
65. Okorodudu AO, Burnett RW, McComb RB, Bowers GN Jr: Evaluation of three first-generation ion-selective electrode analyzers for lithium: systematic errors, frequency of random interferences, and recommendations based on comparison with flame atomic emission spectrometry, *Clin Chem* 36:104-110, 1990.
66. Hansen JL: The measurement of serum and urine lithium by atomic absorption spectrophotometry, *Am J Med Tech* 34:19, 1968.
67. Bertholf RL, Savory MG, Winborne KH, et al: Lithium determined in serum with an ion-selective electrode, *Clin Chem* 34:1500-1502, 1988.
68. Bodman V, Arter T, Masiewicz F, et al: Development of the Kodak Ektachem clinical chemistry slide for lithium (Li), *Clin Chem* 38:1049, 1992 [Abstract].
69. Brzezicki J, Muirhead C, Schmitz J, et al: Acceptable anticoagulants for analysis of calcium and lithium on Beckman's Synchron EL-ISE system, *Clin Chem* 38:1023, 1992 [Abstract].
70. Platman SR, Fieve RR: Biochemical aspects of lithium in affective disorders, *Arch Gen Psychiatry* 19:659-663, 1968.
71. Rybakowski J, Strzyzewski W: Red-blood-cell lithium index and long-term maintenance treatment, *Lancet* 1:1408-1409, 1976 [Letter].
72. Rainbow SJ, Dowson GM, Tickner TR: Non-extraction HPLC method for simultaneous measurement of theophylline and caffeine in human serum, *Ann Clin Biochem* 26:527-532, 1989.
73. Orcutt JJ, Kozak PP, Sherwin AG, Cummins LH: Microscale method for theophylline in body fluids by reversed phase high performance liquid chromatography of theophylline in serum, *Clin Chem* 23:599, 1977.
74. Weidner N, Dietzler DN, Ladenson JH et al: A clinically applicable high pressure liquid chromatographic method for measurement of serum theophylline, with detailed evaluation of interferences, *Am J Clin*



Pathol 73:79, 1980.

75. Soldin SJ, Hill JG: A rapid micromethod for measuring theophylline and reversed phase high pressure liquid chromatography, *Clin Biochem* 10:74, 1977.

76. Desage M, Soubeyrand J, Soun A, Brazier JL: Automated theophylline assay using gas chromatographic and a mass-selective detector, *J Chromatogr* 336:285-291, 1984.

77. Loomi KF, Frye RM: Evaluation of the Abbott TDM™ for the stat measurement of phenobarbital, phenytoin, carbamazepine, and theophylline, *Am J Clin Pathol* 80:686-691, 1983.

78. Klein G, Castineiras J, Collinsworth W, et al: Results of multicenter evaluation of the CEDIA® theophylline line assay, *Wien Klin Wochenschr* 104:31-37, 1992.

79. Henderson DR, Friedman SB, Harris JD, et al: CEDIA®, a new homogeneous immunoassay system, *Clin Chem* 32:1637-1641, 1986.

80. Chan K, Koenig J, Walton KG, et al: The theophylline method of the Abbott "vision" analyzer evaluated, *Clin Chem* 33:130-132, 1987.

81. Mordelet-Dambrine M, Baglin J, Roux A, et al: Comparison between theophylline analysis by nephelometric inhibition immunoassay and high performance liquid chromatography, *Ther Drug Monit* 8:106-110, 1986.

82. Lindberg R, Ivaska K, Irjala K, Vanto T: Determination of theophylline in serum with the Seralyzer® Aris reagent strip test evaluated, *Clin Chem* 32:613-614, 1985.

83. Sood S, Green VI, Nieva LL: Routine methods in toxicology and therapeutic drug monitoring by high-performance liquid chromatography. VI: A rapid microscale method for determination of caffeine in plasma and saliva, *Ther Drug Monit* 11:361-364, 1989.

84. Niemann A, Oellerich M, Schumann G, Sybrecht GW: Determination of theophylline in saliva, using fluorescence polarization immunoassay (FPIA), *J Clin Chem Clin Biochem* 23:725-732, 1985.

85. Jenne JW, Wyze E, Rood FS, McDonald FM: Pharmacokinetics of theophylline: application to adjustment of the clinical dose of aminophylline, *Clin Pharmacol Ther* 13:349-360, 1972.

86. Giacoia G, Jusko WJ, Menke J, Koup JR: Theophylline pharmacokinetics in premature infants with apnea, *J Pediatr* 89:829-832, 1976.

87. Aranda JV, Turmen T, Trippenbach T, et al: Effects of caffeine on control of breathing in infantile apnea, *J Pediatr* 103:975-978, 1983.

88. Rall TW: Drugs used in the treatment of asthma: the methyl-xanthines, cromolyn sodium, and other agents. In Gilman AG, Rall TW, Nies AS, Taylor P, editors: *The Pharmacological basis of therapeutics*, ed 8, New York, 1990, Pergamon Press.

89. Bergmeyer HU: Methods of enzymatic analysis, vol. XII, drugs and pesticides, Weinheim, III, 1986, VCH Publishers.

Tablas

Tabla 56-1. Fármacos comúnmente monitoreados, tiempos recomendados de muestreo, vidas medias, rangos terapéuticos, valores críticos.

Fármaco	Tiempo de muestreo recomendado	Saludable t _{1/2} (horas)	Rango terapéutico (µg/mL)	Rango crítico (µg/mL)
---------	--------------------------------	------------------------------------	---------------------------	-----------------------

Amikacina	0.5-1 hora después de la dosis (valle) y al final del pico del intervalo	0.5 - 3.0	Máx.20 - 30 Mín. <5	Máx.>35 Mín.>10
Amitriptilina	Fin del intervalo de dosis	17 - 40	0.120 - 0.250	>0.500
Carbamacepina	Fin del intervalo de dosis	10 - 60	4 - 11	>15
Ciclosporina	Fin del intervalo de dosis	4.7 - 12.7	0.1 - 0.3	>0.4
Digitoxina	8 - 24 hs. después de la dosis	72 - 384	0.01 - 0.025	>0.035
Digoxina	8 - 24 hs.después de la dosis	20 - 50	0.0008 - 0.002	>0.0024
Etosuccimida	Fin del intervalo de dosis		40 - 100	>150
Gentamicina	0.5-1 hora después de la dosis y fin del intervalo de dosis	0.5 - 3.0	Máx 5 - 10 Mín. <2	Máx >12 Mín. >2
Lidocaína	Durante la infusión	1.2 - 2.3	1.5 - 5.0	> 7
Litio	Fin del intervalo de dosis	14 - 33	0.3 - 1.3 (mmol/L)	> 1.5
Fenitoína	Fin del intervalo de dosis	20 - 100	10 - 20	> 20
Fenobarbital	Fin del intervalo de dosis	50-150	10-40	> 50
Primidona	Fin del intervalo de dosis	4-22	5-12	> 15
Procainamida	Fin del intervalo de dosis	3-5	4-10	> 16*
Salicilato	1-3 hs después de la dosis	3-20	150-300**	>400
Teofilina	Infusión intravenosa a intervalos 4-8, 12-24 y 24 horas después del comienzo de la infusión. Oral o inyección intravenosa; 2 horas después de la dosis 2 horas después de la dosis 4-6 horas después de la dosis	3-12 No fumadores 2-6 , fumadores	8-20	> 20
Tobramicina	0.5-1 hora después de la dosis y fin del intervalo de dosis	0.5-30	Máx.5-10 Mín.<2	Máx.>12 Mín. >2
Vancomicina	1 hora después de la dosis y fin del intervalo de dosis	4-10	Máx 20-40 Mín. 5-10	Máx >80 Mín.>20

* Rango terapéutico que incluye fármaco padre y metabolito ; rango crítico > 35 para ambas.
** Antiinflamatorio.

Tabla 56-2 Métodos para el análisis de anticonvulsivos

Método	Principio	Matriz	Comentario
1- Cromatografía de gases (CG)	Extracción en fase sólida en; columna capilar de C18; detección por ionización de llama.	Sangre, plasma; suero, saliva	Puede resolver todos los anticonvulsivos simultáneamente, requiere extracción de la muestra.

2. Cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC)	Extracción de fármacos con solventes orgánicos o precipitación de proteínas de la muestra; los anticonvulsivos se separan por cromatografía de fase inversa y se monitorean por espectroscopía ultravioleta.	Plasma, suero, saliva	Puede resolver todos los anticonvulsivos simultáneamente excepto el valproato; comúnmente usada
3. Ensayos de unión competitiva			
a. Radioinmunoensayo (RIA)	Unión competitiva de ligando marcado; el hapteno radiomarcado compite con el desconocido por el sitio de unión del anticuerpo.	Plasma, suero, saliva	Se usa rara vez; todos los problemas de uso de radiactividad; más lento que los otros inmunoensayos
b. Técnica de inmunoensayo amplificado enzimáticamente (TIAE)	Unión competitiva con el fármaco unido a la enzima	Plasma, suero, saliva	Puede medir todos los fármacos, pero debe hacerse cada uno por separado; comúnmente usada; puede usar analizadores químicos de rutina
c. Inmunoensayo enzimático fluorescente (IEF)	Combinación de unión competitiva con enzima-conjugado marcado por el sitio de unión al anticuerpo (en una matriz de fase sólida) y cromatografía radial.	Plasma, suero, saliva	Mide todos los anticonvulsivos excepto valproate y etosisuximida
d. Inmunoensayo de polarización de fluorescencia (IPF)	Unión competitiva con el fármaco marcado con fluoresceína; el fármaco fluorescente compite con el desconocido por el sitio del anticuerpo.	Plasma, suero, saliva	Cada compuesto se analiza individualmente; requiere instrumentación especializada; es el más frecuentemente usado
e. Ensayo del grupo prostético marcado	La unión del anticuerpo al fármaco marcado con el grupo prostético impide la actividad de la glucosa oxidasa. La competencia con fármacos endógenos permite que el grupo prostético active a la enzima. La glucosa oxidasa se acopla a una reacción colorimétrica	Suero	Diseñado para instrumentación económica; espectrofotómetro de reflectancia; prueba rápida
f. Inmunoensayo de inhibición de la velocidad nefelométrica	Unión competitiva por el hapteno; el complejo proteína-hapteno compite con el desconocido por el sitio de unión al anticuerpo	Plasma, suero	Cada fármaco se analiza individualmente; requiere instrumentación especializada



g. Inmunoensayo del donador enzimático clonado IDEC	Unión competitiva con el conjugado donador enzimático (DE)-ligando por el sitio de unión al anticuerpo. El fármaco endógeno modula la actividad enzimática afectando el conjugado DE libre-ligando disponible para la complementación.	Suero	Cada fármaco se analiza individualmente; requiere instrumentación especializada; actualmente no se utiliza ampliamente

Tabla 56-3 Métodos para la medición de ciclosporina A (CsA)

Método	Principio	Uso	Comentarios
1. Cromatografía Líquida de alta Resolución (HPLC)	Extracción de CsA de una matriz biológica seguida de una cromatografía HPLC en fase inversa y detección a 210 nm - 214 nm.	Menos común	- Mide fármaco padre - Método laborioso - Inadecuado para análisis de urgencia tipo stat
2. Radioinmunoensayo (RIA)	Unión competitiva de CsA marcada radioactivamente y CsA no marcada, a una cantidad limitada de anticuerpo monoclonal o policlonal	Menos común	- Problemas referidos al uso y desecho de material radioactivo - Reacción cruzada con metabolitos
2. Inmunoensayo por polarización fluorescente (IPF)	Unión competitiva de CsA marcada con fluoresceína y CsA no marcada, a una cantidad limitada de anticuerpo. La cantidad medida de luz fluorescente plana polarizada está relacionada en forma inversa a las concentraciones de CsA del paciente.	Método más frecuentemente usado	- Automatizado - Reacción cruzada con metabolitos
3. Inmunoensayo del donador enzimático clonado (IDEC)	Unión competitiva de CsA marcada con enzima y CsA no marcada, a una cantidad limitada de anticuerpo. La actividad de la enzima marcadora decrece después de unirse al anticuerpo. Por lo tanto, la actividad enzimática está directamente relacionada a la concentración de CsA del paciente.	Recientemente introducido	- Automatizado - Mayor especificidad comparado con IPF

Tabla 56-4 Métodos de análisis para gentamicina

2275

Método	Principio	Uso	Comentario
1. Radioinmunoensayo (RIA)	La unión competitiva ocurre entre la gentamicina radiomarcada y la gentamicina del suero del paciente.	Poco frecuente	- Sensible, específico, exacto, uso de radioisótopos - Inadecuado para análisis de urgencia tipo Stat
2. Inmunoensayo de Polarización Fluorescente (IEPF)	La unión competitiva ocurre entre el fármaco marcada con fluoresceína y el fármaco del suero del paciente. El fármaco marcado unido al anticuerpo tiene polarización fluorescente más alta que la que tiene el fármaco libre.	Frecuente	- Sensible, específico, exacto - Adecuado para análisis de urgencia tipo Stat - Automatizado
3. Técnica de Inmunoensayo Enzimático Amplificado (IDEC)	La unión competitiva ocurre entre la gentamicina marcada con enzima y la gentamicina del suero del paciente por la unión al anticuerpo. La unión de la gentamicina marcada con enzima al anticuerpo produce una pérdida de la actividad enzimática.	Frecuente	- Sensible, específico, exacto. - Adecuado para análisis de urgencia tipo Stat - Automatizado.

Tabla 56-5. Dosis habituales y concentraciones séricas deseadas ($\mu\text{g/mL}$) para aminoglucósidos

ANTIBIÓTICO	DOSIS NORMAL*	PICO†	VALLE‡	RANGO TÓXICO
1. Gentamicina	3-6 mg/Kg/día	5-10	< 2	$P_1 > 12$
Tobramicina	dividido cada 8 h			$T_1 > 2$
2. Netilmicina	4-8 mg/Kg/día	6-12	< 3	$P_1 > 15$
	dividido cada 8 h			$T_1 > 3$
3. Amikamicina	10-20 mg/Kg/día	20-30	< 5	$P_1 > 35$
	dividido cada 8 h			$T_1 > 10$
4. Estreptomicina	15 mg/Kg/día	5-20	< 5	> 40-50
	dividido cada 12 h			
* Para adultos con función renal normal.				
† Concentración en el pico P_1 determinada una hora después de una dosis intramuscular o 30 minutos después de una dosis intravenosa.				
‡ Concentración en el valle, T_1 , determinada justo antes de la próxima dosis.				

Tabla 56-6 Métodos para análisis de litio

Método	Tipo de análisis	Principio	Uso
1. Espectrometría de emisión atómica	Cuantitativo	Emisión de luz de un átomo inestable de litio a 670.8 nm	Uso poco frecuente Suero, plasma
2. Espectrometría de absorción atómica	Cuantitativo	Absorción de luz a 670.8 nm por litio en el estado basal	Uso poco frecuente Suero, plasma, orina, eritrocitos
3. Electrodo selectivo de iones	Cuantitativo	La interacción de litio con un ionóforo específico para litio genera una diferencia de voltaje proporcional a la concentración de litio	El método más comúnmente usado Suero, plasma, sangre total Se requiere corrección por sodio endógeno
4. Colorimétrico	Cuantitativo	Litio + colorante de éter de corona (400 nm) → Complejo colorido	Comúnmente usado Suero, plasma

Tabla 56-7 Métodos para el análisis de teofilina

Método	Tipo de análisis	Principio	Uso	Comentario
1- Ultravioleta	Espectrofotométrico	Extracción de teofilina; medición de la absorción a dos longitudes de onda.	Suero, plasma	Histórico
2. Cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC)	Cromatográfico con destección espectrofotométrica	Dependiendo del método, el análisis de la muestra extraída o no extraída se hace por cromatografía de fase inversa.	Suero, plasma	Posible método de referencia
3. Inmunoensayo de polarización de fluorescencia (IPF)	Unión competitiva con polarización de fluorescencia	El fármaco marcado unido tiene una mayor fluorescencia polarizada y es inversamente proporcional a la cantidad del fármaco no marcado.	Suero, plasma	Comúnmente usado
4. Técnica de inmunoensayo amplificado por enzima (TIAE)	Unión competitiva con la marca enzimática	La unión del anticuerpo al hapteno-enzima inhibe la reactividad catalítica; la competencia por el compuesto a analizar en la muestra impide la inhibición.	Suero, plasma	Comúnmente usado



5. Inmunoensayo enzimático usando una enzima genéticamente construida (IDEC)	Unión competitiva con detección espectrofotométrica	La enzima se ha sintetizado en dos fragmentos (donador enzimático, DE y aceptante enzimático, AE); la asociación de DE y AE forma una enzima activa que degrada un sustrato produciendo un cambio de color; el fármaco y el fármaco marcado con DE compiten por un anticuerpo, y una mayor cantidad del fármaco permite que más DE permanezca libre para unirse a AE, creando la actividad enzimática.	Suero, plasma	
6. Inmunoensayo de inhibición enzimática	Unión competitiva con detección espectrofotométrica	El conjugado fármaco-inhibidor compete con el fármaco por sitios de un anticuerpo; la unión del conjugado al anticuerpo produce una reducción en la inhibición de la enzima; la cantidad del producto formado es inversamente proporcional a la concentración del fármaco.	Suero, plasma, sangre total	
7. Inmunoensayo de inhibición de la velocidad nefelométrica (IIN)	Unión competitiva con detección nefelométrica	El conjugado hapteno-proteína compete con el fármaco para unirse al anticuerpo; la producción de los complejos proteína-anticuerpo aumenta la dispersión de luz; la cantidad de fármaco libre es inversamente proporcional a la velocidad del aumento en la dispersión de luz	Suero, plasma	
8. Inmunoensayo de inhibición turbidimétrica (IIT)	Unión competitiva con inhibición turbidimétrica	El conjugado partícula-fármaco marcado compete con el fármaco libre para unirse al anticuerpo; la velocidad de formación del agregado es inversamente proporcional a la cantidad del fármaco.	Suero, plasma	
9. Inhibición enzimática	Inhibición no competitiva y detección espectrofotométrica del producto	La conversión del sustrato a producto por fosfatasa alcalina de hígado bovino es inhibida por el fármaco; la cantidad de producto formado es inversamente proporcional a la cantidad del fármaco.	Suero, plasma	Tecnología de capa fina

10. Ensayo del grupo
prostético marcado

Unión competitiva
con procedimiento
enzimático

La unión del anticuerpo al
fármaco marcado con el grupo
prostético impide la actividad
de la glucosa oxidasa; la
competencia con el fármaco
permite que el grupo prostético
active a la enzima; la actividad
está acoplada a una reacción
colorimétrica.

Suero

Figuras

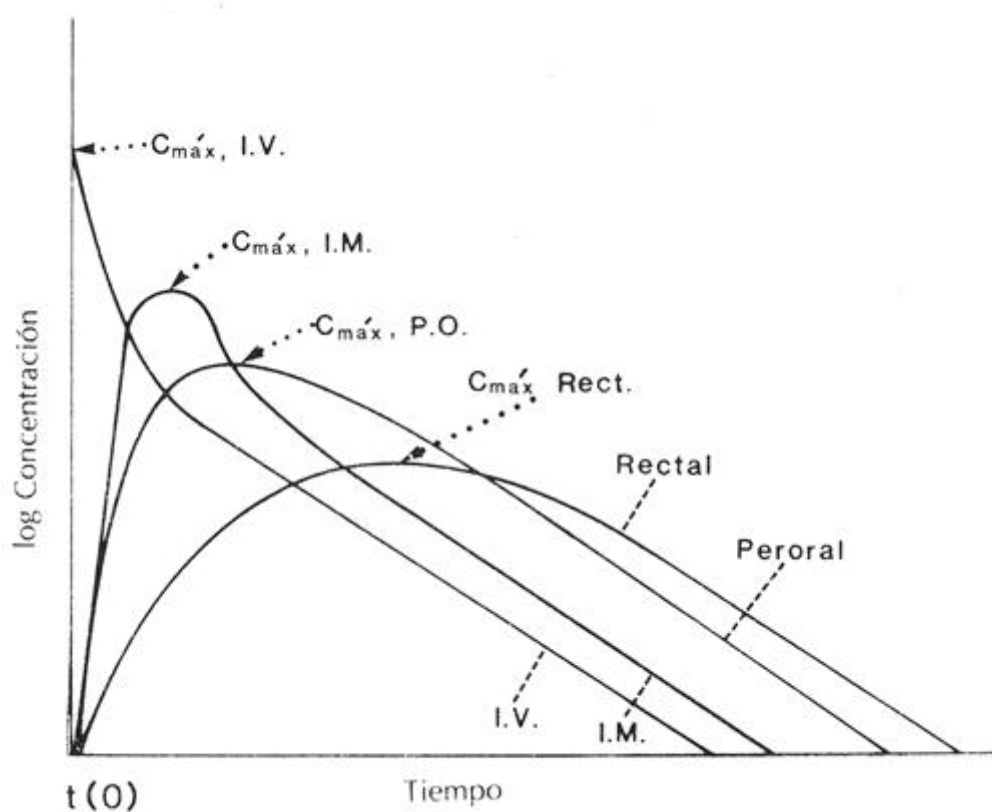


Figura 56-1 Curvas de nivel-tiempo sanguíneas de un fármaco hipotético bajo diferentes rutas de administración

Figura 56-2 Influencia del proceso de liberación de un fármaco en el desarrollo de las curvas de nivel-tiempo sanguíneas. *I*, Tableta de disolución rápida; *II*, tableta con una velocidad de disolución menor; *III*, tableta de liberación sostenida; *IV*, tableta de baja disponibilidad.

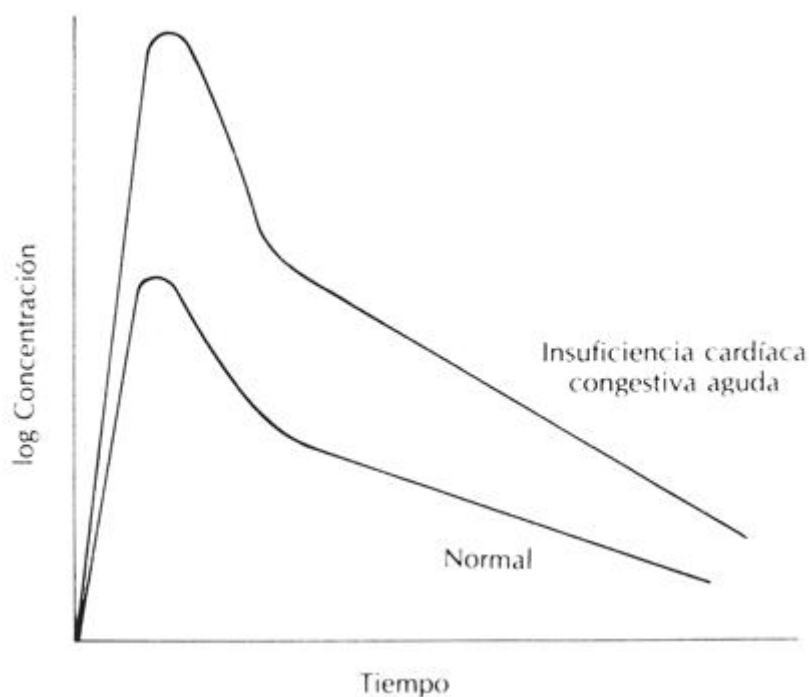


Figura 56-3 Influencia del proceso de distribución en el desarrollo de las curvas de nivel-tiempo sanguíneas de digoxina. Se observa un nivel sanguíneo alto en insuficiencia cardíaca congestiva aguda debido a un volumen de distribución disminuido.

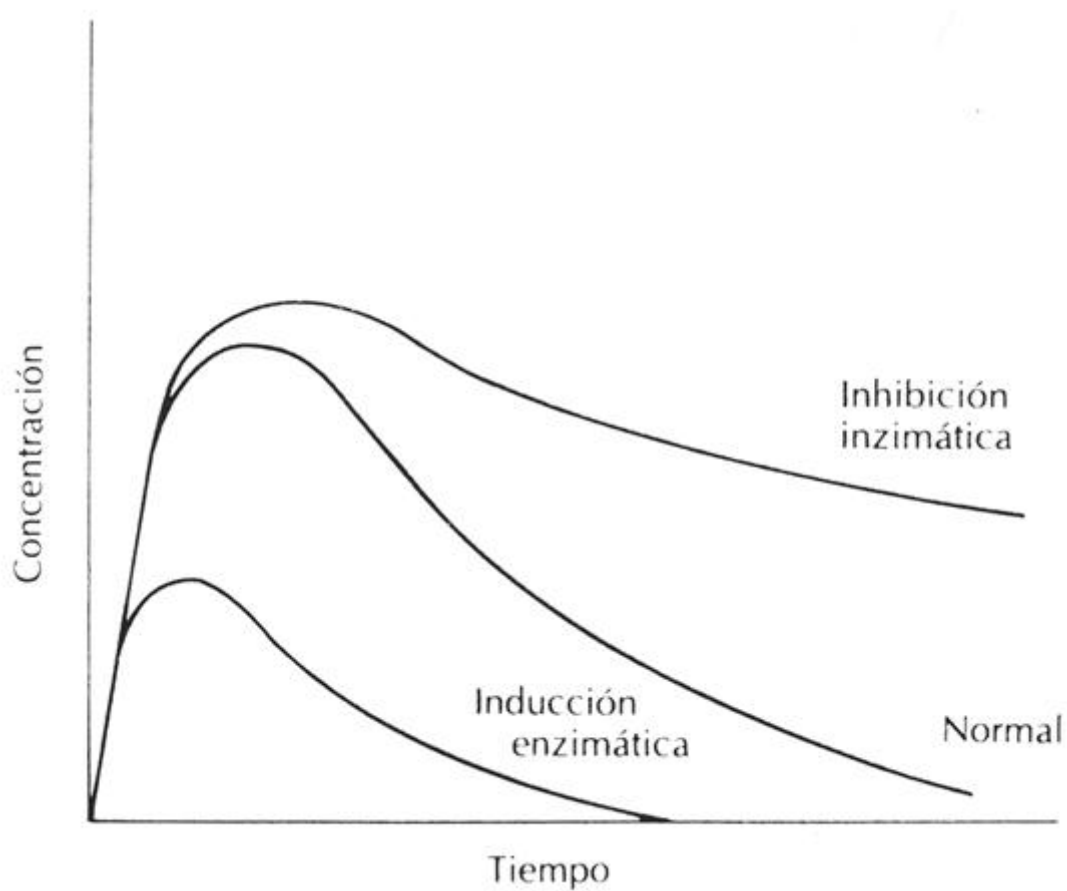


Figura 56-4 Influencia de los procesos metabólicos en el desarrollo de las curvas de nivel-tiempo sanguíneas. La inhibición enzimática y el daño hepático pueden aumentar considerablemente el nivel sanguíneo, mientras que la inducción enzimática puede disminuirlo.

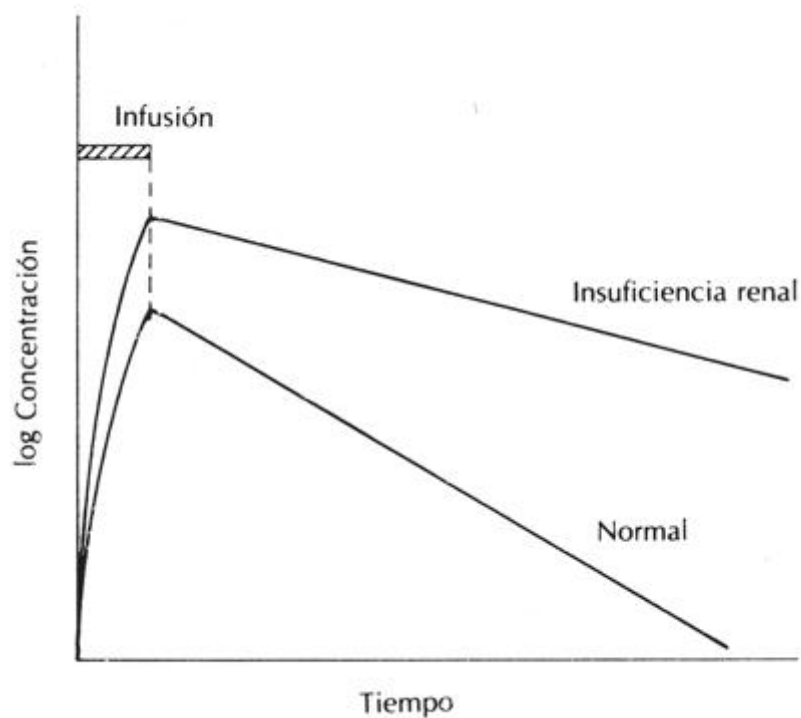


Figura 56-5 Influencia de los procesos de eliminación en el desarrollo de la curva de nivel-tiempo sanguínea de gentamicina. En presencia de insuficiencia renal, la concentración pico después de una infusión de corto plazo es más alta y el nivel sanguíneo permanece elevado con una vida de eliminación más larga.

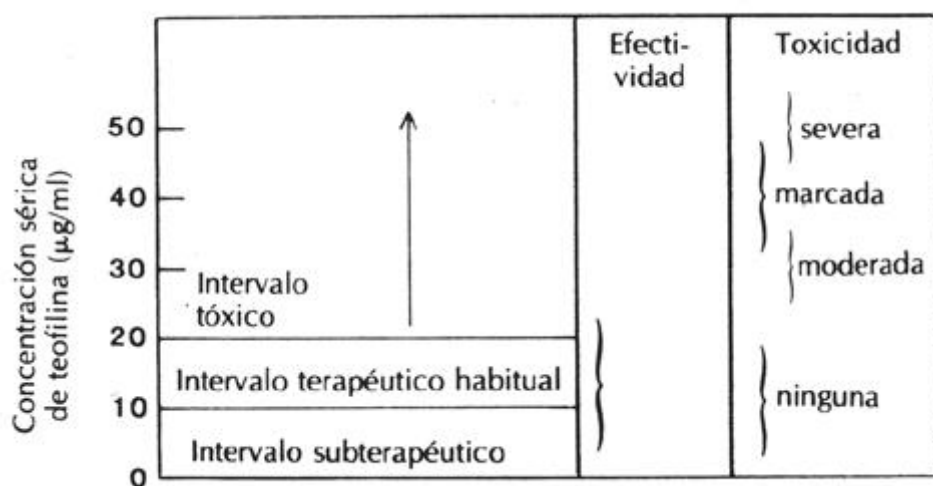


Figura 56-6 Relación entre la concentración de teofilina sérica, efectividad y toxicidad.

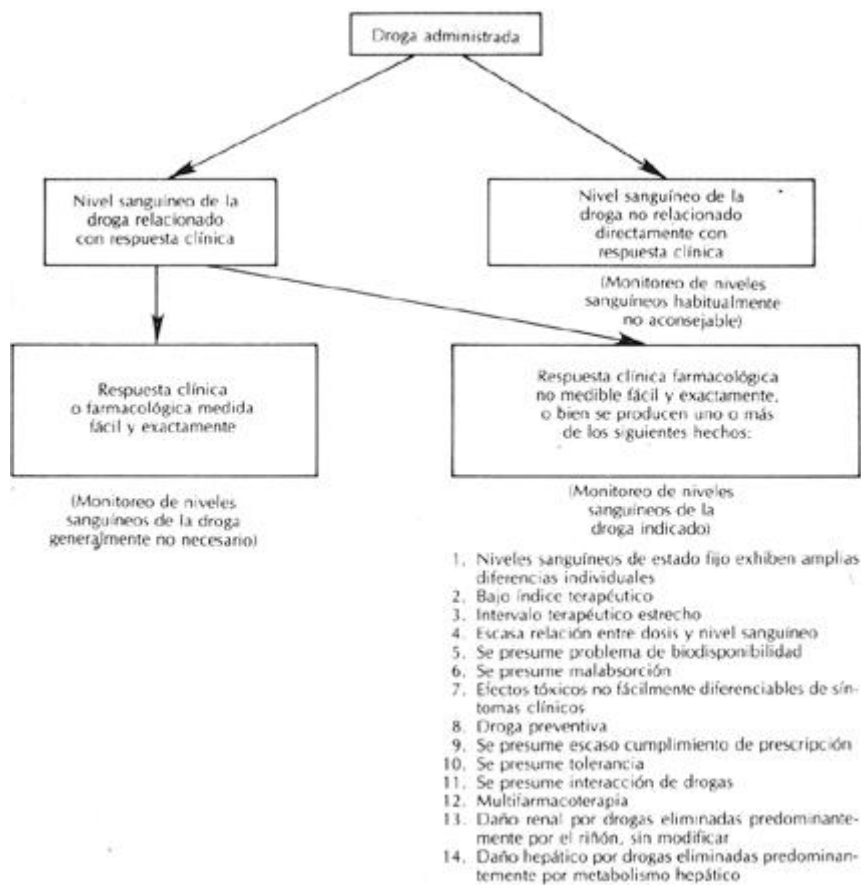


Figura 56-7 Esquema para identificar casos y situaciones cuando está indicado el monitoreo de un fármaco. (Modificado de Pippenger CE: *Ther Drug Monitor* 1:3-9, 1979.)

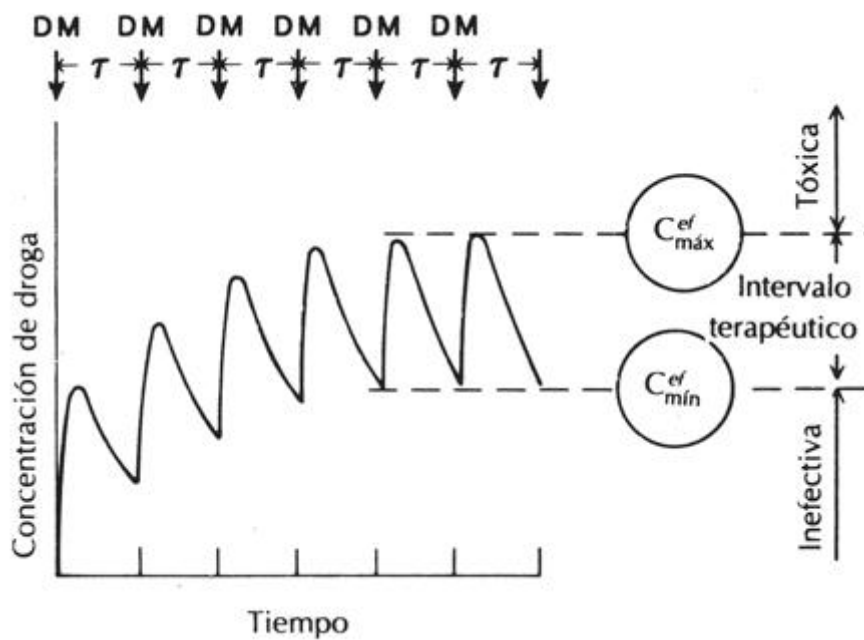


Figura 56-8 Gráfica de las concentraciones sanguíneas del fármaco como función de la dosis y el tiempo. DM , Dosis; τ , intervalo entre las dosis C_{\max}^{ss} , concentración máxima en estado de equilibrio; C_{\min}^{ss} , concentración mínima en estado de equilibrio. En esta muestra se escogió τ como el equivalente a la vida media de eliminación.

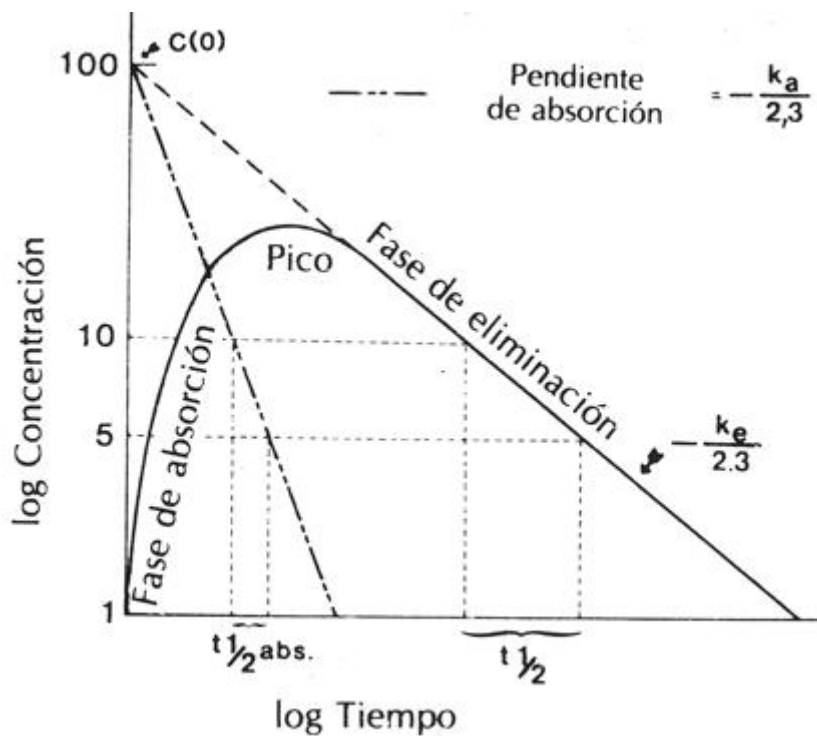


Figura 56-9 Curva de nivel-tiempo sanguínea para un modelo de un compartimento después de la administración extravascular, con pendientes de eliminación no exponenciales, k_e , y de absorción, k_a . (De Ritschel WA: *Graphic approach to clinical pharmacokinetics*, Barcelona, 1983, JR Prous.)

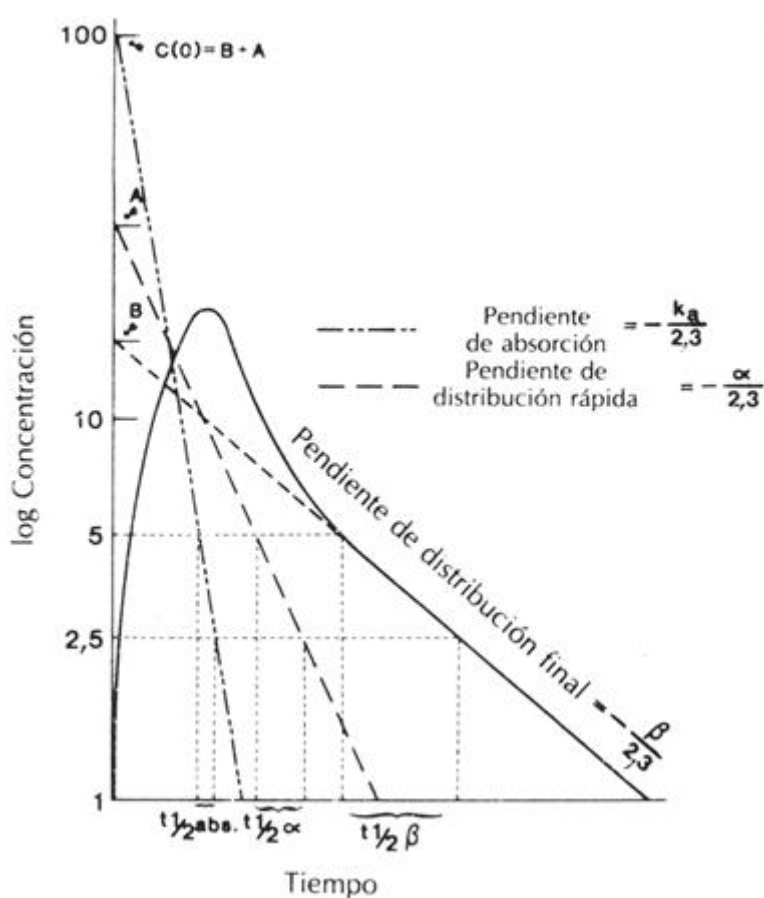


Figura 56-10 Curva de nivel-tiempo sanguínea en un modelo de dos compartimentos después de la administración extravascular, con pendientes monoexponenciales de disposición lenta, β ; disposición rápida, α ; y absorción, k_a . (De Ritschel WA: *Graphic approach to clinical pharmacokinetics*, Barcelona, 1983, JR Prous.)

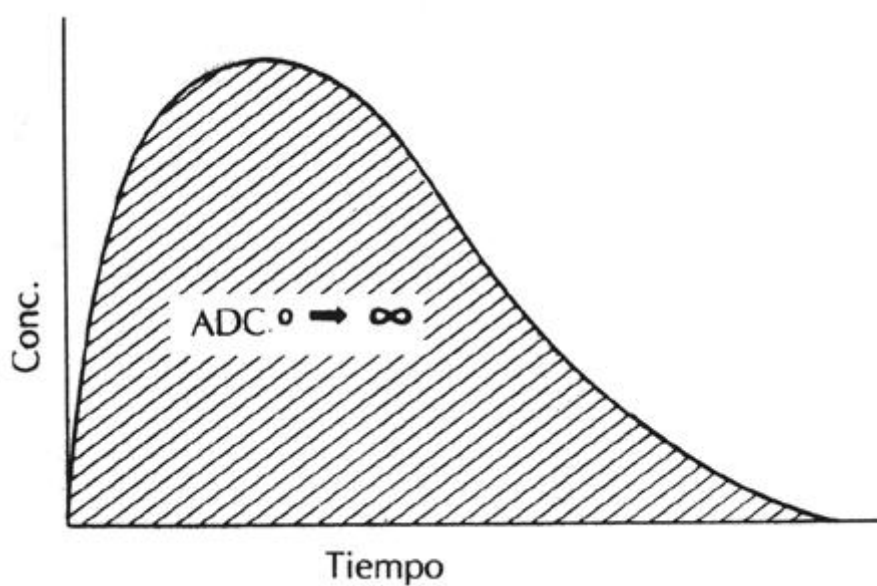


Figura 56-11 Esquema del área total bajo la curva de nivel-tiempo sanguínea.
 $AUC^{0 \rightarrow \infty}$, Area bajo la curva desde el tiempo = 0 hasta el tiempo = ∞ . (De Ritschel WA:
Graphic approach to clinical pharmacokinetics, Barcelona, 1983, JR Prous.)

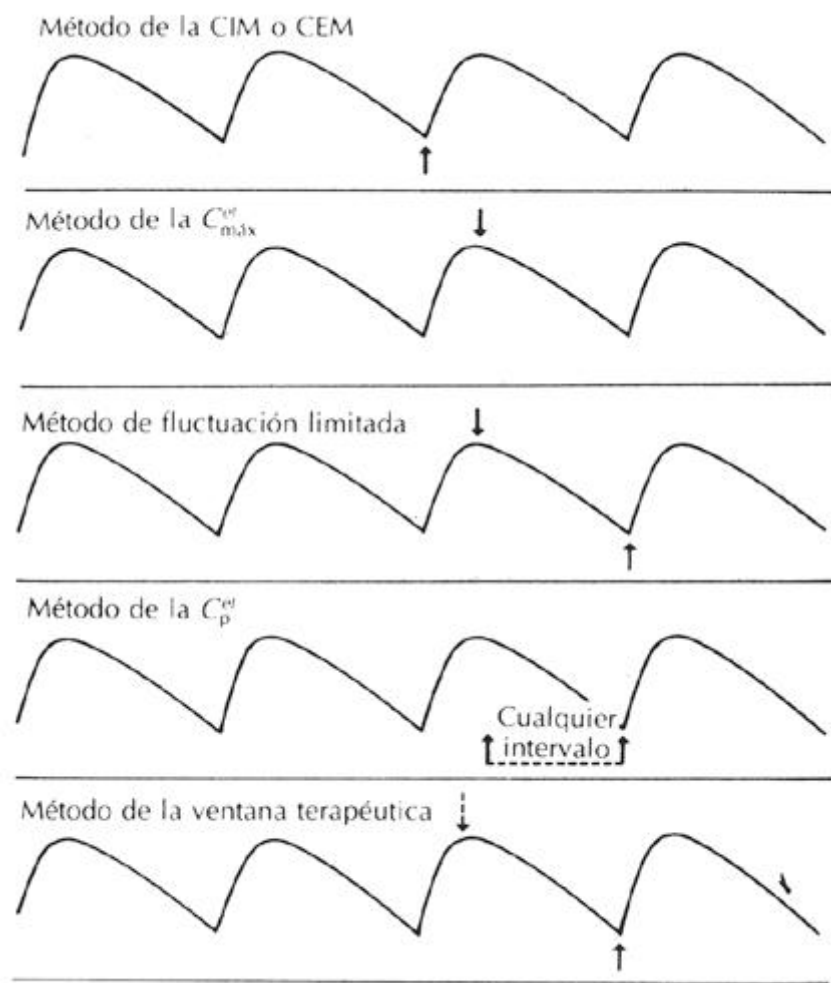


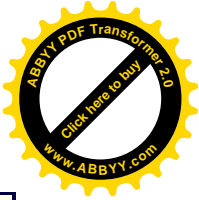
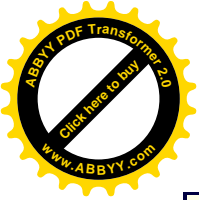
Figura 56-12 Esquema que muestra los tiempos de muestreo óptimos para monitoreo por diferentes métodos usados en regímenes de dosificación.

CAPÍTULO 57

57. Análisis de Orina.

G. Berry Schumann
Susan C. Schweitzer

Introducción y utilidad clínica del uroanálisis.



Colecta de especímenes.

Examen físico de la orina.

Volumen

Olor

Apariencia (color y turbidez)

Gravedad específica

Osmolalidad

Examen químico de la orina.

Constituyentes normales

Análisis en tiras reactivas

Análisis confirmatorios

pH urinario

Proteínas

Azúcares

Cetonas

Sangre y mioglobina

Bilirrubina

Urobilinógeno

Nitritos

Leucocitos

Porfirinas

Melanina

Examen microscópico de la orina

Métodos

Estandarización

Cristales

Organismos

Células

Cilindros renales

Grasas

Citología de orina

Cálculos (litiasis)

Hallazgos en enfermedades renales comunes y del tracto urinario inferior

Enfoque coordinado para el uroanálisis

Control de calidad.

OBJETIVOS

- Entender el método adecuado de recolección de especímenes de orina para un análisis específico.
- Discutir las propiedades físicas más importantes de la orina y sus relaciones con la enfermedad.
- Identificar los constituyentes químicos más importantes de la orina, como cuantificarlos, y como confirmar su presencia.
- Describir métodos adecuados para estandarización de los especímenes de orina y de los hallazgos microscópicos más comunes.
- Enumerar los hallazgos comúnmente observados en enfermedades renales y del tracto urinario inferior.
- Entender los procedimientos de control de calidad propios del análisis de la orina.

Términos clave

albuminuria. Incremento en la concentración de albúmina en la orina.

aminoaciduria Exceso de uno o más aminoácidos en la orina.

análisis húmedo de orina Prueba de tamizaje para de la orina que combina una valoración fisicoquímica y un examen del sedimento urinario en una preparación húmeda no coloreada.

análisis de orina por tira húmeda Examen químico de la orina empleando tiras reactivas de prueba para la determinación de albúmina, glucosa, cetonas, bilirrubina, hemoglobina, bacterias, leucocitos, y otros constituyentes químicos.

análisis por tira reactiva Uso de tiras de prueba conteniendo reactivos químicos para determinar si hay concentraciones patológicas de diversas sustancias en la orina.

bacteriuria Presencia de bacterias en la orina.

bilirrubinuria Presencia de bilirubina en la orina.

cálculos Concreciones anormales, usualmente compuestas de sales, presentes en el sistema urinario u otros tejidos; una piedra renal.

cateterización Inserción de un instrumento delgado, flexible y tubular en la vejiga o uréter para obtener o sacar orina.

células pálidas Neutrófilos de tinción tenue, hinchados y degenerados, que se encuentran en la orina diluida, los cuales tienen gránulos citoplasmáticos que presentan un movimiento browniano característico.

cetona Cualquier compuesto que contiene un grupo carbonilo -CO- y grupos de hidrocarburos unidos al carbono del grupo carbonilo.

cetonuria Presencia de cetonas en la orina, las cuales son un producto intermedio del metabolismo de las grasas, como ocurre en la diabetes mellitus.

cilindros Estructura cilíndrica formada como resultado de conglutinación de células y precipitación de proteínas en el lumen de los túbulos convolucionados distales y ductos colectores del nefrón, los cuales son expulsados en el sedimento urinario.

cilindros hialinos Cilindros transparentes formados de mucoproteína.

cilindruria Presencia de cilindros en la orina.

cistitis Inflamación de la vejiga.

citodiagnóstico de orina Análisis especializado de orina que combina una valoración fisicoquímica y un examen del sedimento urinario concentrado teñido para Papanicolaou.

cristales amorfos Precipitado de sales no cristalino, granular, sin importancia patológica.

cristaluria Presencia de cristales en la orina.



- diurético** Un agente que promueve la producción de orina.
- eritrocituria** Presencia de eritrocitos en orina.
- eritrocituria dismórfica** Presencia de fragmentos de eritrocitos en el sedimento de orina indicativos de hematuria renal (glomerular y tubular).
- funguria** Presencia de hongos en la orina.
- glomérulo** Enrollamiento de vasos sanguíneos que se proyecta en el extremo de la cápsula de cada uno de los túbulos uriníferos del riñón.
- glucosuria** Presencia de glucosa en la orina.
- gravedad específica** El peso de una sustancia comparada con un volumen igual de otra sustancia tomada como estándar.
- hematuria** Presencia de sangre en la orina.
- hemoglobinuria** Presencia de hemoglobina libre en la orina.
- hidrómetro** Instrumento empleado en medir la gravedad específica de un fluido.
- levadura** Microorganismo unicelular nucleado que se reproduce por gemación.
- melanina** Pigmento oscuro amorfo presente en la piel, cabello, y diversos tumores. Es producido por la polimerización de productos de oxidación de la tirosina y compuestos dihidroxifenólicos; contiene carbono, hidrógeno, nitrógeno, oxígeno y, a menudo, azufre.
- mioglobinuria** Presencia de hemoglobina en la orina, esta es una proteína que se combina con el oxígeno de las células musculares.
- necrosis tubular aguda** Enfermedad caracterizada por la destrucción de las células del epitelio tubular renal, está comúnmente asociada con la reducción de la circulación (isquemia) en los túbulos renales o la exposición a agentes tóxicos.
- nefritis** Inflamación del riñón.
- nefrosis** Una enfermedad del riñón.
- piuria** Cantidad anormal de leucocitos en orina.
- porfirinas** Un grupo de derivados del pirrol libres de hierro o magnesio que se encuentran universalmente en todas las células. Estos compuestos constituyen la base de los pigmentos respiratorios en animales y plantas.
- proteinuria** Incremento en la concentración de proteína en la orina.
- recuento de Addis.** Análisis cuantitativo del sedimento urinario, en el cual se cuantifica el número de eritrocitos, leucocitos y cilindros en un espécimen de orina recolectado en un determinado tiempo.
- tinción de Papanicolau** Tinción diferencial que ayuda a la identificación de la cromatina nuclear, propiedades citoplásmicas como la queratinización, elementos no celulares (como cristales y cilindros) y elementos hematopoyéticos.
- urobilinógeno** Grupo de compuestos incoloros formados por la reducción de la bilirrubina conjugada por la acción de bacterias intestinales. Cerca del 1% del total del urobilinógeno producido pasa a la orina.
- virus** Agente que se autorreplica, consta de una estructura fundamental de ácidos nucleicos encapsulados por una cubierta de proteínas. Este microorganismo puede multiplicarse solamente dentro de las células de su hospedero.

Introducción y Utilidad Clínica del Análisis de Orina

El análisis de orina realizado en el laboratorio clínico, puede proporcionar una información amplia, variada y útil del riñón de un individuo y de las enfermedades sistémicas que pueden afectar este órgano excretor. Por medio de este análisis, es posible elucidar tanto desórdenes estructurales (anatómicos) como desórdenes funcionales (fisiológicos) del riñón y del tracto urinario inferior, sus causas, y su pronóstico. La realización cuidadosa del examen de orina, por parte del laboratorio, ayuda al diagnóstico diferencial de numerosas enfermedades del sistema urinario. Usualmente, los datos de laboratorio obtenidos por medio de este análisis, se logran sin dolor, daño o tensión para el paciente. Esta es la razón por la cual, la realización e interpretación correcta del análisis de orina, por parte del laboratorio permanecerá siempre como una herramienta esencial de la práctica clínica.

En la actualidad, se practican tres tipos de exámenes de orina: *análisis de orina por tira húmeda*, empleado generalmente por los médicos en sus consultorios y por los pacientes en sus casas; *tamizaje de análisis húmedo de la orina*, comúnmente llamado análisis básico o rutinario de orina; y *citodiagnóstico de la orina*, que es una evaluación citológica especializada del sedimento urinario que correlaciona con los análisis realizados por medio de la tira reactiva. El análisis de orina realizado con la *tira húmeda* es un ensayo de primera etapa para la detección y monitoreo de pacientes con anormalidades químicas. [refs\(2170\)](#) Los pacientes diabéticos a menudo monitorean permanentemente su propia enfermedad, buscando signos de glucosuria, proteinuria, e infecciones del tracto urinario, mediante pruebas realizadas en casa. [ref\(2171\)](#)

El análisis de orina *húmedo o rutinario*, proporciona, a costos razonables, un tamizaje adecuado para la detección de anormalidades químicas y morfológicas presentes en la orina. Este procedimiento se compone de dos partes: 1) un análisis macroscópico, en el cual se determinan las características fisicoquímicas (apariencia, gravedad específica y la medición de los constituyentes químicos por medio de la tira), y 2) un examen microscópico del sedimento, en campo claro o contraste de fases, para verificar hematuria, piuria, cilindruria, cristalluria, y otros signos. Por medio de este simple examen de orina, un uromicroscopista experimentado puede detectar y monitorear muchas entidades que afectan al riñón y al tracto urinario inferior. [refs\(2172\)](#)

Recientemente, el citodiagnóstico de la orina ha ganado aceptación médica como un análisis nuevo, más sensible en el diagnóstico de ciertas patologías renales y del tracto urinario inferior. [refs\(2173\)](#) Como este análisis requiere mayor inversión de tiempo debido a la preparación de coloraciones, debe reservarse para pacientes sintomáticos con enfermedades renales, del tracto urinario inferior, o neoplasias. Este análisis especializado ha reemplazado al recuento de Addis, proporcionando información secuencial del progreso o regresión de muchas de las patologías renales o del tracto urinario inferior. [ref\(2174\)](#)

El propósito de este capítulo, dirigido a los laboratorios médicos o de química clínica, es describir en forma breve las metodologías más comúnmente empleadas en la mayoría de los laboratorios de análisis rutinarios, haciendo énfasis en las responsabilidades del laboratorio de uroanálisis en los siguientes aspectos: 1) procedimientos y equipos más comunes; 2) calidad de los reactivos; 3) sensibilidad, especificidad, y limitaciones de cada procedimiento; 4) pruebas confirmatorias; 5) identificación precisa de los elementos principales del sedimento urinario empleando microscopía de campo claro; y 6) control de calidad. Se discutirá la importancia

técnica y diagnóstica de los resultados del análisis urinario y los mecanismos de las enfermedades que producen anormalidades en dichas pruebas. Se hace énfasis en la importancia que tiene la revisión de literatura para ampliar y mejorar conocimientos.

Colecta de Especímenes

El cuidado en la recolección de la orina y su entrega rápida en el laboratorio, son cruciales para obtener una información óptima.[refs\(2175\)](#) La orina debe ser colectada en un recipiente limpio, estéril, que tenga un cierre seguro para prevenir posibles derramamientos, evaporación o contaminación. Estos recipientes deben rotularse con el nombre del paciente, fecha y hora de recolección.

La primera orina de la mañana es usualmente la mejor para el análisis porque es la orina más concentrada. Se debe obtener una colecta en que no se produzca contacto del recipiente con el área distal de la uretra para evitar la contaminación de la muestra. Las muestras deben estar libres de secreciones vaginales u otra clase de partículas extrañas. Kunin[ref\(2176\)](#) describe minuciosamente, una variedad de técnicas de recolección para las enfermedades del tracto urinario.

Para que los datos del uroanálisis sean precisos, es esencial que la orina sea examinada dentro de las dos horas siguientes a su recolección o preservada de alguna manera, usualmente por refrigeración (2° a 8° C). Se pueden usar fijadores o preservativos adecuados, siempre y cuando se entiendan claramente sus efectos sobre la orina y sobre los ensayos en ella realizados. Si la orina es recolectada sin preservativos y permanece a temperatura ambiente se empezará a descomponer. Los preservativos actúan impidiendo los cambios químicos asociados a la descomposición y previniendo el crecimiento y metabolismo de los microorganismos. El tolueno, fenol, timol y preservativos ácidos son usados frecuentemente para los análisis químicos de la orina. Otras formas de preservación incluyen el ajuste del pH y la protección de la luz. Para preservar las estructuras celulares puede emplearse etanol (95%), hay también disponibles fijadores comerciales como Mucolxxx y Saccomanno. Los laboratorios son responsables de la selección adecuada del tipo y cantidades de preservativo de la de orina necesarios para preservar las estructuras celulares.

Para cuantificar diversos aspectos de la función renal, frecuentemente se emplean análisis de orina recolectada durante un determinado período de tiempo. La orina debe reflejar la excreción en un intervalo de tiempo medido con precisión. Estos especímenes no deben incluir la orina que se encuentra en la vejiga antes de la iniciación de la recolección. En la toma de muestras de orina de 24 horas, se debe desechar la orina de la primera micción de la mañana del día en el cual se inicia la recolección y recolectar toda la orina producida durante 24 horas, incluyendo la primera orina de la mañana del segundo día. La Tabla 57-1 muestra los tipo de especímenes de orina recomendados según el examen requerido.

Cuando una muestra es recibida para un análisis de orina, los laboratoristas que realizan el ensayo, deben tomar la decisión de aceptarlo o no. Se deben establecer por escrito, criterios específicos acerca de la forma de recolección, signos visibles de contaminación, identificación incompleta o incorrecta, tipo inapropiado de especímenes o preservativos, y el tiempo transcurrido después de la recolección.



Examen Físico de la Orina

El examen físico de la orina es la parte inicial del análisis rutinario de la orina. Este examen incluye una valoración del volumen, olor, apariencia (color y turbidez), y gravedad específica u osmolalidad.

Volumen.

El volumen urinario está influenciado por la ingesta de líquidos; por los solutos excretados, principalmente, sodio y urea; por la pérdida de fluidos en la transpiración y la respiración; y por el estado de los sistemas cardiovascular y renal. Normalmente un adulto excreta de 750 a 2000 mL en 24 horas. En el capítulo 26 se discuten las condiciones que llevan al incremento o disminución en la cantidad de orina. Aunque el volumen de orina de un espécimen recolectado al azar no tiene importancia clínica, el volumen del espécimen recibido debe ser anotado para efectos de documentación y estandarización.

Olor

Una orina normal fresca tiene un olor inofensivo. Un olor desagradable, puede indicar que el espécimen es demasiado viejo para obtener un análisis preciso. Un olor fétido en un espécimen recolectado desde hace más de dos horas (y no preservado o refrigerado) indica que el espécimen es inadecuado. El olor puede también dar señales de ciertas anomalías de la orina. Un olor parecido al amoníaco, es sugestivo de presencia de bacterias degradadoras de la urea, un olor a frutas indica la presencia de acetona (cetona), un olor dulce es sugestivo de la presencia de glucosa u otros azúcares, un olor fétido es sugestivo de pus o inflamación. El olor es importante en la detección clínica de la enfermedad llamada orina de miel de maple (un defecto metabólico congénito).

Apariencia (color y turbidez).

El color de la orina está determinado, en gran medida, por su grado de concentración. Las orinas normales varían ampliamente de colores, desde incoloras hasta amarillo oscuro. La interpretación del color es subjetiva y varía según el laboratorio que la examine. Para que el analista describa adecuadamente el color de la orina, puede emplear como puntos de referencia una escala estandarizada de colores, evitando el uso de términos ambiguos como *pajizo* o sangriento. En la Tabla 57-2 hay un listado de los colores comunes de la orina.

La orina roja es, tal vez, la coloración de mayor importancia clínica. Este color puede ser producido por hemoglobina urinaria o mioglobina, eritrocitos intactos, eritrocitos hemolisados, o hemoglobina libre (hemólisis). La hemólisis puede producirse intravascularmente o después de que la orina se ha formado. La mioglobulinuria ocurre rara vez y es el resultado de una severa destrucción muscular. La hemoglobina urinaria y la mioglobina no pueden diferenciarse por simple inspección o por análisis sencillos. La ingestión de remolacha o de ciertos fármacos puede también enrojecer la orina y por lo tanto estos cromógenos deben ser excluidos como causa de coloración.

En la glomerulonefritis aguda el color característico de la orina es pardo rojizo. La orina es ácida y contiene sangre, esta combinación produce un color parduzco debido a la formación de hematina ácida. La sangre en la orina también puede producir una apariencia ahumada. Esto se puede observar agitando la orina y observándola contra la luz. El “humor” o turbidez es producido en realidad por eritrocitos en suspensión, en este caso después de la centrifugación aparecerá un sobrenadante claro con un botón rojo en el fondo del tubo. La apariencia ahumada debida a los eritrocitos no debe confundirse con la turbidez pálida producida por otros elementos en suspensión como cristales y células.

Normalmente una orina fresca es clara. Cuando la orina se deja reposar, se precipitan cristales amorfos, generalmente ureatos, produciendo turbidez. La turbidez de la orina debe ser registrada y explicada mediante la evaluación microscópica. La Tabla 57-3 enumera las causas más comunes de turbidez en la orina.

Gravedad específica.

La gravedad específica de la orina es una medida parcial de la capacidad del riñón para concentrar orina. Su rango normal es de 1.003 a 1.035 g/mL. Los valores iguales o superiores a 1.020 indican una buena función renal y la excreción de una cantidad aumentada de solutos disueltos excretados por los riñones. Valores de densidad específica iguales o superiores a 1.035 indican la presencia de solutos extraños, lo cual debe ser investigado. En la deshidratación, diabetes mellitus, insuficiencia cardíaca congestiva, proteinuria e insuficiencia adrenal se encuentra una gravedad específica con valores mayores a 1.030. Una disminución de la gravedad específica se observa en pacientes con hipotermia o en quienes usan diuréticos. En pacientes con enfermedad renal severa, la orina es producida con una gravedad específica fija, que es igual a la del filtrado glomerular, esto es, aproximadamente 1.010. Los constituyentes del sedimento son pobremente preservados en orinas diluidas, por lo tanto en orinas con una gravedad específica baja, el análisis microscópico del sedimento puede no producir resultados óptimos.

Las sustancias de alto peso molecular afectan la gravedad específica en un grado mayor que la producida por simples cristaloides. Esto es importante cuando la orina contiene moléculas grandes como glucosa, proteínas o medios de contraste radiográficos. Cuando se presentan niveles elevados de glucosuria o proteinuria, es necesario aplicar factores de corrección para ajustar la gravedad específica a un valor más representativo; se debe restar 0.004 por cada 10 g/l de glucosa y 0.003 por cada 10 g/l de proteína. Valores de 1.040 o superiores están asociados con la presencia de medios de contraste radiográficos o preservativos.

La gravedad específica se puede medir empleando un hidrómetro y un recipiente apropiado. El uso de los hidrómetros tiene varias limitaciones: 1) requieren un volumen grande de orina (10 a 15 mL); 2) están calibrados para ser usados a 20°C, si la orina no está a esta temperatura de referencia se deben aplicar factores de corrección; 3) los hidrómetros no pueden ser recalibrados. Por estas razones, los laboratorios ya no emplean estos elementos.

La mayoría de los laboratorios poseen refractómetros que relacionan la densidad de una solución con la gravedad específica (ver capítulo 4). El uso de estos refractómetros tiene algunas ventajas: 1) requieren solo una o dos gotas de orina; 2) tienen la temperatura compensada; 3) las lecturas están menos afectadas por la densidad que las de los urinómetros; y 4) poseen un tornillo para calibrar a cero. Su gran desventaja es el costo.



Es esencial aplicar regularmente una metodología para la calibración. Debe verificarse con agua destilada y calibrarse con soluciones estandarizadas de sales o sacarosa.

Método del refractómetro

1. Limpie la superficie de la cubierta con un paño húmedo y luego séquela.
2. Usando dos aplicadores o pipetas capilares, aplique una gota de orina en la muesca de la cubierta y deje fluir la orina por acción capilar, sobre la superficie del prisma.
3. Coloque el refractómetro contra una fuente de luz y lea el valor de la gravedad específica directamente en la escala para gravedad específica allí donde se forma una nítida línea divisoria entre la luz y el contraste oscuro.
4. Para una gravedad específica mayor a 1.030, diluya la orina con partes iguales de agua y lea. Multiplique los tres últimos dígitos por tres. [ref\(2177\)](#)

Método de la tira reactiva.

Las tiras reactivas disponen de un método colorimétrico indirecto para medir la gravedad específica. Este método usa una tira que contiene un electrolito pretratado que muestra un cambio de pH de acuerdo a la concentración iónica de la orina. Este ensayo es rápido, sencillo y no requiere equipos adicionales. El producto empleado no debe presentar interferencias con glucosa, proteínas, o medio de contraste radiográficos. La sensibilidad de este método es menor que la del refractómetro (0.005 unidades) y las muestras de orina con pH de 6.5 o mayores requieren factor de corrección.

Método de la gota que cae.

El método de la gota que cae es un método directo para la determinación de la gravedad específica usado en equipos automatizados, como el Cliniteck Auto 2000 (Ames Division, Miles Laboratories, Inc., Elkhart Indiana). Este instrumento usa aceite de silicona en una columna especialmente diseñada. La gravedad específica esta relacionada con el tiempo que tarda una gota de orina en caer una distancia definida por dos aperturas ópticas. Este procedimiento es más específico y preciso que el refractómetro y más preciso que el uso de hidrómetros. [ref\(2178\)](#)

Osmolalidad

El riñón normal es capaz de producir orina con un rango de 50 a 1200 mOs/Kg (ver capítulo 26). Los rangos de la osmolalidad en orina oscilan desde 1/6 a cuatro veces la osmolalidad del suero normal (280-290 mOs/Kg). La osmolalidad es medida por un osmómetro (ver capítulo 14).

La osmolaridad está determinada por el número de partículas por unidad de masa, mientras la gravedad específica es un reflejo de la densidad (tamaño o peso) de las partículas en suspensión. Generalmente la gravedad específica y la osmolaridad son directamente proporcionales de un modo lineal, aunque hay excepciones importantes. Por ejemplo, si a un paciente se le administran medios de contraste yodados por pielografía intravenosa, la gravedad específica puede elevarse hasta 1.070 o 1.080, mientras que la osmolalidad permanecerá dentro de los límites normales. Las partículas de contraste tienen una masa lo suficientemente grande para elevar la gravedad específica, pero hay muy pocas moléculas



presentes que puedan producir un notable incremento en la osmolalidad.

Examen Químico de la Orina

Varios constituyentes químicos son analizados rutinariamente en el uroanálisis. Para su análisis se emplean tiras reactivas cualitativas y tabletas, además de métodos cuantitativos para determinación de proteínas, electrolitos y porfirinas.

Constituyentes normales.

La orina está formada por numerosas sustancias químicas. La Tabla 57-5 enumera los constituyentes químicos más comúnmente medidos por los laboratorios de uroanálisis.

Análisis por tira reactiva.

Los análisis por tira reactiva han permitido a los laboratorios de uroanálisis producir resultados químicos semicuantitativos de una manera rápida, exacta y eficiente. En general, los análisis de orina adecuadamente realizados por medio de tiras reactivas, son sensibles, específicos y económicos.

El laboratorio de uroanálisis es responsable de seleccionar los tipos más adecuados de tiras reactivas para su hospital o práctica clínica. Las siguientes guías son importantes para asegurar mejores resultados:

1. Para pruebas rápidas de orina; use solamente las lecturas de los análisis cronometrados.
2. Tenga cuidado con las sustancias que producen interferencias.
3. Entienda las ventajas y limitaciones del ensayo.
4. Emplee controles.

Los análisis realizados por medio de tiras reactivas deben efectuarse en orinas bien mezcladas y equilibradas a la temperatura ambiente. Cada parámetro químico debe ser evaluado en un intervalo de tiempo específico, de acuerdo a lo indicado en las instrucciones del fabricante. Deben tomarse del envase, solamente el número de tiras requerido para los análisis inmediatos y el envase debe taparse nuevamente asegurando que la tapa quede bien ajustada. Las tiras reactivas deben ser almacenadas en un lugar fresco (no refrigeradas). El medio ambiente debe estar libre de humedad. Nunca se deben usar tiras para orina caducadas o expuestas al aire. [ref\(2179\)](#)

Después de sumergir la tira reactiva en la orina, se debe remover el exceso de orina golpeando la tira suavemente en el borde del recipiente que contiene el especimen. Se debe comparar individualmente la reacción de cada zona reactiva con su correspondiente en la carta de colores, bajo una iluminación adecuada. Hay disponible una amplia variedad de lectores automáticos de tiras reactivas (fotómetros de reflectancia). En la Tabla 57-6 se anota la sensibilidad de dos tipos de tiras para pruebas múltiples, que son disponibles comercialmente. Los resultados positivos de las tiras reactivas pueden requerir confirmaciones por métodos químicos y microscópicos. La información proporcionada por los fabricantes debe ser revisada para identificar fuentes de inhibidores y resultados falsos positivos y negativos. El ácido ascórbico presente en la orina, puede interferir con las reacciones de la tira reactiva para glucosa, hemoglobina, bilirrubina y nitritos. Se ha exhortado a los fabricantes a minimizar o



eliminar estas interferencias porque es común la ingestión de suplementos de vitamina C. [ref\(2180\)](#) Con objeto de verificar los resultados de las tiras reactivas es esencial el uso de muestras para control de calidad.

Pruebas confirmatorios.

Muchos laboratoristas equiparan un análisis confirmatorio con la verificación de un parámetro dado. Esto no confirma nada; solo establece el grado de precisión para ese parámetro. [refs\(2181\)](#) Un análisis confirmatorio, es aquel que establece la exactitud de otro procedimiento. Algunos ejemplos de análisis confirmatorios son los ensayos cuantitativos de proteínas, electroforesis de proteínas, cultivos para bacterias, y el aspecto citológico (Tabla 57-7). Un análisis confirmatorio debe tener la misma o mejor especificidad, estar basado en principios diferentes, y tener una sensibilidad igual o mejor que la de la prueba original.

pH Urinario.

Aunque el método estándar para la medición del pH emplea electrodos de vidrio, el pH urinario, usualmente, es medido con indicador de papel, debido al hecho de que pequeños cambios en el pH son de poca importancia clínica. La mayoría de los laboratorios de uroanálisis emplean tiras reactivas multitest con dos indicadores, rojo de metilo y azul de bromotimol. Estos indicadores proporcionan un rango de pH de 5.0 a 9.0, el cual se manifiesta por un cambio de color de naranja (ácido) a verde y azul (alcalino). El rango de pH urinario es 4.7 a 7.8. Las muestras de orina extremadamente ácidas o alcalinas, usualmente indican especímenes mal recolectados.

El pH es importante para el manejo clínico de las piedras o cristales. Los cálculos de ácido úrico se precipitan en orinas ácidas y son más solubles en orinas básicas. En orina alcalina se precipitarán cálculos de calcio y fosfato de calcio, mientras que la orina ácida tiende a disolverlos. Durante las terapias con sulfonamidas y estreptomicina, es deseable una orina alcalina para prevenir la precipitación de medicamentos en los riñones y la formación de cálculos de ácido úrico, cistina y oxalatos. Un pH alcalino debe mantenerse en el tratamiento de las reacciones debidas a transfusión y a la intoxicación con salicilatos. En la cistitis el pH debe mantenerse ácido para combatir la bacteriuria y prevenir la formación de cálculos alcalinos. Los analistas deben estar conscientes de que una orina alcalina interfiere con la determinación de proteínas y puede alterar el examen del sedimento urinario.

Proteínas

Las personas sanas pueden tener una excreción diaria de proteínas de 100 mg/día, una fracción muy pequeña del contenido de proteínas plasmáticas. La mayoría de la proteína en la orina es albúmina que pasa la membrana glomerular, pero también pueden estar presentes proteínas de peso molecular pequeño como las globulinas. Una vez filtradas las proteínas son casi completamente reabsorbidas en el túbulo proximal. La proteinuria, por lo tanto, puede ser el resultado tanto de un incremento en la filtración como de una disminución en la reabsorción (función tubular).

Las tiras reactivas son un procedimiento de tamizaje para la proteinuria. Como la especificidad de las tiras reactivas está limitada a la detección de albúmina, es altamente recomendable que el laboratorio procese simultáneamente una prueba por tira reactiva y una prueba de precipitación por ácido para la detección de todos los tipos de proteínas. Las tiras



reactivas son sensibles al pH y dependen de la presencia de proteínas para la generación de color (error de proteína de Sørensen). La presencia de la proteína en la tira cambia el pH del medio de contraste impregnado en la zona reactiva, produciéndose el cambio de color

pH 3

Azul de tetrabromofenol —————→ Resultados positivos (*azul verdoso*)
Proteína

pH 3

Azul de tetrabromofenol —————→ Resultados negativos (*amarillo*)
Sin proteína

Un resultado positivo o débilmente positivo debe ser confirmado por otros métodos más específicos como el ácido tricloroacético o el ácido sulfosalicílico. Un resultado débilmente positivo y uno fuertemente positivo pueden indicar la presencia de fármacos o proteínas de Bence Jones.

Ensayo del ácido sulfosalicílico y método de turbidez semicuantitativo

Principio

Las proteínas desnaturalizadas por el ácido se precipitan produciendo una turbidez que es progresivamente mayor de acuerdo al incremento en la concentración de las proteínas.

Materiales

Acido sulfosalicílico al 3%, (30g/L) en solución acuosa.

Tubos de ensayo de 13 x 100 mm.

Procedimiento

1. Añada 3 mL de reactivo de ácido sulfosalicílico a 1 mL de orina centrifugada.
 2. Mezcle y deje en reposo 5 minutos.
 3. Observe el grado de turbidez (ver Tabla que acompaña, no numerada en la parte de abajo) y compare la muestra analizada con el especimen original en un tubo de 13 x 100 mm.
- La orina de individuos sanos no debe presentar turbidez y las proteínas representarán menos de 75 mg/L. La Tabla 57-9 muestra la sensibilidad, tipos de proteínas detectadas, y fuentes de resultados falsos negativos y positivos para análisis realizados con tiras reactivas y ácido sulfosalicílico. Hay disponibles estándares comerciales de ácido sulfosalicílico.

Reporte de confirmación de turbidez con ASS

Grado proteína	Turbidez *	Rango de (mg/L)
Ninguno	Claro	# 75
Trazas	Se puede ver y leer fácilmente un material impreso cuando	200
1+	No se puede ver y leer fácilmente un material impreso alguna dificultad cuando se cuando se mira a través del tubo	300-1000



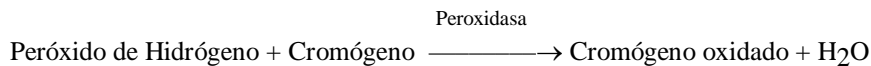
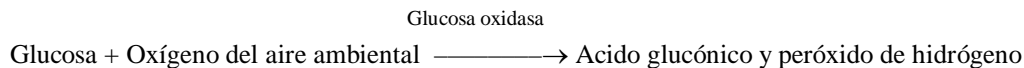
2+	Se puede ver pero no leer fácilmente un material impreso cuando se mira a través del tubo.	1000-2500
3+	No se puede ver un material impreso cuando se mira a través del tubo.	2500-4500
4+	Se ha formado un precipitado.	>4500

* Claridad de la orina al paso de la luz en un espécimen colocado en un tubo transparente.

Azúcares

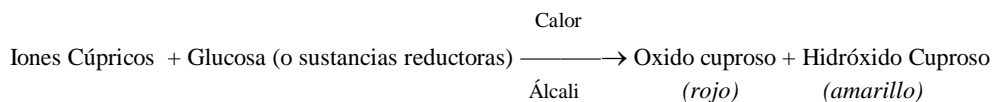
Ensayos enzimáticos.

El ensayo de la tira reactiva es un excelente análisis específico para glucosa. Detecta la oxidación de la glucosa a ácido glucónico:



Una clase de tira reactiva emplea *o*-toluidina como el cromógeno indicador de la reacción.

Reducción del Cobre (Clinitest y prueba de Benedict)



La tableta Clinitest (Ames Division, Miles Laboratories, Inc., Elkhart, Indiana) brinda la posibilidad de detectar otros azúcares. Este es un ensayo basado en la reducción del cobre que mide el total de sustancias reductoras presentes en la orina. Además de glucosa, el Clinitest puede detectar azúcares como galactosa, lactosa y pentosa. También puede reaccionar con el ácido ascórbico y ciertos fármacos como ácido nalidíxico (GramNeg) empleado para el tratamiento de infecciones del tracto urinario, Probenecid empleado en el tratamiento de la gota y cefalosporina, un antibiótico.

Clinitest es un ensayo importante en el tamizaje pediátrico. Un resultado negativo obtenido por medio de una tira reactiva (específica para glucosa) pero positivo para Clinitest puede detectar la presencia de desórdenes metabólicos congénitos en el recién nacido.

Clinitest puede detectar sustancias reductoras a una concentración de 200 mg/L o más alta. Las tiras reactivas detectarán concentraciones de glucosa de 400 a 750 mg/L. Ya que Clinitest es menos sensible y específico que las tiras reactivas, no puede ser empleado como ensayo confirmatorio para resultados positivos de glucosa obtenida por medio de la tira. Clinitest debe reservarse para poblaciones de pacientes en quienes se necesita detectar sustancias reductoras diferentes a la glucosa.

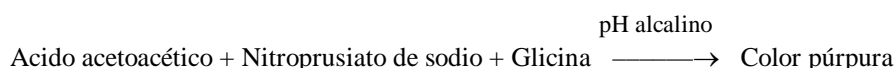
Los azúcares aparecerán en la orina por un incremento en la carga de filtración, como en la diabetes mellitus, o por disminución de la reabsorción tubular, como en la glucosuria



renal. La presencia de ácido ascórbico puede producir resultados erróneos bajos.

Cetonas.

El término *cuerpos cetónicos* incluye tres componentes químicos diferentes pero muy relacionados: ácido acetoacético, ácido beta hidroxibutírico y acetona (ver pág. 631 en capítulo 32). Los ensayos realizados por medio de tiras reactivas emplean la reacción de nitroprusiato de sodio que detecta acetona y ácido acetoacético pero no beta hidroxibutírico, el cuerpo cetónico primario. Es importante saber que el reactivo de nitroprusiato de sodio reacciona principalmente con el ácido acetoacético; la acetona tiene solo un 20% de reactividad comparada con el ácido acetoacético:

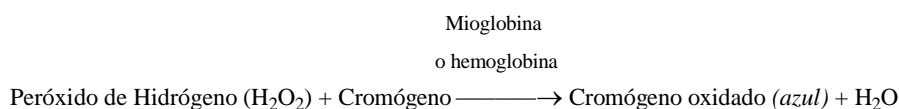


La determinación de cetonas es importante en el monitoreo de la diabetes y de la cetoacidosis y debe realizarse siempre que se determinen azúcares.

Sangre y mioglobina

Como se discutió anteriormente, una orina roja indica usualmente la presencia de eritrocitos, hemoglobina o mioglobina. La hematuria, a menudo, representa una combinación de eritrocitos intactos (más de 5 por campo de alto poder), eritrocitos fragmentados y hemoglobina libre. La hematuria gruesa o macroscópica implica hemorragia o sangrado fresco, lo que en un medio de orina ácida, da como resultado una apariencia de roja a parda, turbia, o ahumada.

El método empleado por la tira reactiva para determinar hemoglobina o mioglobina se fundamenta en una actividad semejante a la de las peroxidasas:



Un ensayo positivo indica la presencia de hematuria, hemoglobinuria o mioglobinuria, siendo necesario un análisis microscópico para confirmar la presencia de eritrocitos. La presencia en la orina de agentes oxidantes como los yoduros y bromuros, puede causar resultados falsos positivos; grandes cantidades de ácido ascórbico (usado en algunos antibióticos) pueden producir resultados falsos positivos en algunas tiras reactivas.

La mioglobina es una porfirina ferrosa similar a la hemoglobina; se encuentra, comúnmente, en la orina en pacientes con traumas severos que involucran destrucción muscular. Cuando la mioglobina es liberada a la circulación, es rápidamente excretada por el riñón. Al igual que la hemoglobina, su presencia producirá orinas de apariencia rosada a roja. La mioglobina debe ser confirmada siempre por métodos rápidos de inmunodifusión o por radioinmunoensayo.

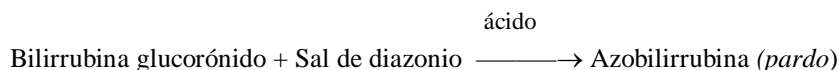
Bilirrubina

Orinas espumosas, de color amarillo a pardo, u oscuras son sugestivas de la presencia de bilirrubina conjugada. La orina normal no contiene bilirrubina. Los pacientes ictericos con



enfermedad hepatocelular como hepatitis o enfermedad obstructiva como cirrosis biliar pueden tener bilirrubina conjugada en la orina.

El método empleado por las tiras reactivas para determinar bilirrubina se basa en la reacción de diazoación.



Los resultados negativos de orinas sospechosas y los resultados positivos cuestionables provenientes de orinas coloreadas, deben ser confirmados empleando tabletas de Ictotest (Ames Division, Miles Laboratories, Inc., Elkhart, Indiana). El Ictotest emplea la misma reacción de diazoación que las tiras reactivas. Se pueden encontrar resultados falsos negativos, en orinas no frescas porque la bilirrubina urinaria puede hidrolizarse u oxidarse por acción de la luz.

Urobilinógeno

El urobilinógeno es un compuesto coloreado, resultado de la reducción de la bilirrubina por acción de las bacterias en el intestino (ver capítulo 27). Las orinas normales contienen pequeñas cantidades de urobilinógeno. El urobilinógeno se encuentra disminuido en niños deficientes en bacterias intestinales; en pacientes después de la administración de antibióticos que reducen la flora intestinal, y en pacientes con enfermedades obstructivas hepáticas. Se encuentra un aumento del urobilinógeno en pacientes con anemias hemolíticas (aumento de formación de bilirrubina) y disfunción hepática.

El método empleado por las tiras reactivas para la determinación del urobilinógeno varía según el fabricante. Ames emplea la reacción de Erlich, usando *p*-dimetilaminobenzaldehído en una reacción simple de color con el profobilinógeno. Esta reacción no es específica para urobilinógeno, pudiéndose encontrar resultados falsos positivos con otros compuestos que también reaccionan con el reactivo de Ehrlich (porfobilinógeno, PAS). Boehringer Mannheim Diagnostics emplea una reacción específica para el urobilinógeno: el urobilinógeno reacciona con un compuesto de diazonio produciéndose un color rojo.

Para la determinación del urobilinógeno es necesario un espécimen fresco porque el compuesto es sensible a la luz. El espécimen preferido para la determinación cuantitativa del urobilinógeno urinario es una orina recolectada durante las dos primeras horas de la tarde. Este tiempo de recolección se debe a los patrones de excreción diurna del urobilinógeno.

Nitritos

El ensayo de nitritos es empleado en los laboratorios de uroanálisis para detectar bacteriuria. El método empleado en las tiras reactivas para determinar nitritos se basa en la reducción de nitratos a nitritos por la acción enzimática de ciertas bacterias presentes en la orina. En un pH ácido los nitritos reaccionan con el ácido *p*-arsanílico formando un compuesto de diazonio, el cual a su vez reacciona con N-(1-naftil)etiléndiamina produciendo un color rojo.^{ref(2182)} El ensayo de nitritos debe ser realizado en especímenes recolectados en la primera orina de la mañana o en una muestra de orina que haya sido recolectada después de 4 horas o más, a partir de la última evacuación de la vejiga, con el fin de permitir que durante este tiempo los microorganismos metabolizan el nitrato dentro de la vejiga. En orinas pasadas o viejas, el

ensayo de nitritos puede ser positivo como resultado de la contaminación con bacterias después de la micción. La prueba de nitritos es específica para organismos gram negativos, sin embargo, se pueden obtener resultados falsos negativos si están presentes microorganismos como enterococos, estreptococos o estafilococos. La sensibilidad de la prueba de nitritos es del 60% comparada con procedimientos microbiológicos.[ref\(2183\)](#) Hay muy pocos casos de falsos positivos en la prueba de nitritos.

Esta prueba es de dudoso valor en el análisis de orinas en medios hospitalarios, porque no hay controles efectivos sobre la forma y tiempo de recolección de las muestras. En clínicas y consultorios médicos tiene mayor validez porque allí se puede tener un control más adecuado sobre las muestras.

Esterasa leucocitaria

La presencia de leucocitos (piuria) es un indicador de inflamación clínicamente importante. El método empleado para la determinación de leucocitos intactos y lisados en las tiras de orina está basado en la presencia de esterases intracelulares. Estas enzimas catalizan la hidrólisis de los ésteres, liberando componentes que son luego empleados en una reacción de color. La intensidad de la reacción de color es directamente proporcional a la cantidad de leucocitos presentes en el espécimen. En la Tabla 57-6 se muestra la sensibilidad de dos clases de tiras reactivas. La presencia de tricomonas y agentes oxidantes pueden producir falsos positivos. Aunque no está bien establecido, los eosinófilos y los histiocitos también pueden producir reacciones falsas positivas. Se pueden encontrar resultados falsos negativos con niveles altos de proteínas y ácido ascórbico. Varios estudios han documentado la utilidad clínica de la prueba de leucocitos como un tamizaje para la piuria, y muchos profesionales de laboratorio creen que un examen microscópico para leucocitos solamente debe realizarse en orinas positivas para esterasa, realizada por tira reactiva.[refs\(2184\)](#)

Porfirinas

Las porfirinas son productos intermedios en la biosíntesis del hemo y citocromos, los cuales son producidos en el hígado y en la médula ósea (ver capítulo 27). La identificación de diversas porfirinas y precursores de porfirinas (especialmente porfobilinógeno) es importante en el diagnóstico clínico de las porfirias, un grupo de trastornos metabólicos genéticos. En orinas normales la excreción de porfirinas es aproximadamente de 2 mg/día. Un incremento en la cantidad de excreción de porfirinas (porfirinuria) produce una orina de color rojo o vino. El análisis de tamizaje para porfobilinógeno en orina está basado en la prueba de Waston-Schwartz (ver pág. 714).[ref\(2185\)](#) Hay disponibles ensayos confirmatorios cuantitativos.

Melanina

Las orinas normales no contienen melanina. La melanina se encuentra en orinas de pacientes con melanoma maligno. Los pacientes con esta neoplasia maligna excretan precursores incoloros de melanina (melanógenos), los cuales al ser expuestos al aire se polimerizan formando un pigmento oscuro de melanina. Los análisis para tamizaje emplean cloruro férrico que oxida los melanógenos a melanina, la cual vuelve la orina a un color pardo oscuro.



Examen Microscópico de la Orina

Métodos

Una identificación microscópica precisa del sedimento urinario es importante para el reconocimiento temprano de infecciones, procesos inflamatorios, y neoplasias que pueden afectar el tracto urinario.[ref\(2186\)](#) Está en debate si todos los especímenes de orina deben someterse rutinariamente al análisis microscópico, el cual exige mayor inversión de tiempo. En su lugar, la mayoría de los trabajadores del laboratorio, están de acuerdo en que el examen microscópico de orina solo debe practicarse a pacientes sintomáticos, cuando el médico lo requiera específicamente y cuando se encuentre un análisis macroscópico anormal, es decir, cuando se encuentre hematuria, proteinuria o piuria (resultado de nitratos o esterasa positivos).[refs\(2187\)](#)

Existen algunos procedimientos microscópicos establecidos para realizar el examen del sedimento urinario. La microscopía de campo claro estandarizada es aún la técnica que se emplea más frecuentemente.[ref\(2188\)](#) Las coloraciones supravitales pueden ser combinadas con la microscopía de campo claro para mejorar el detalle celular. La microscopía de contraste de fases es, probablemente, el mejor método para evaluaciones rápidas del sedimento de orina sin el uso de tinciones. Comercialmente hay disponibles métodos estandarizados de lectura del sedimento urinario en láminas, que son superiores a los métodos convencionales realizados en laminillas de vidrio y cubre objetos, brindando una alternativa práctica con respecto al uso de la cámara de conteo hemocitómetro.[ref\(2189\)](#)

Hasta la fecha la automatización no ha sido aceptada ampliamente por la necesidad de identificar y clasificar numerosas entidades presentes en el sedimento urinario. Están en vía de desarrollo, sistemas para automatizar parcialmente el análisis microscópico de la orina, empleando citometría de flujo o flujo celular montado en un escenario microscópico.

Estandarización.

La estandarización del examen microscópico de la orina es necesaria para reducir la ambigüedad y minimizar la subjetividad.[ref\(2190\)](#) Los aspectos del examen microscópico que deben estandarizarse son:

1. El volumen de la orina analizada.
2. La longitud y fuerza de la centrifugación.
3. El volumen de resuspensión y concentración del sedimento.
4. El volumen y cantidad del sedimento examinado.
5. La terminología y forma del reporte.

Microscopía de campo claro de una orina no teñida.

La microscopía de campo claro no coloreada emplea luz reducida para delinear los elementos más translúcidos de la orina, como, cilindros hialinos, cristales y filamentos de moco.

La identificación precisa de leucocitos, macrófagos, células del epitelio tubular renal, y células que contienen inclusiones virales puede ser muy difícil en preparaciones no coloreadas. Para confirmar los resultados deben emplearse técnicas citológicas y preparaciones teñidas.[refs\(2191\)](#)

Procedimiento. La orina debe examinarse mientras esté fresca, algunas células y cilindros



pueden desintegrarse en un lapso de una a tres horas. La refrigeración de 2° a 8° C por 48 horas, usualmente previene la desintegración de las células y entidades patológicas. Con propósitos de estandarización, cada especimen de orina debe concentrarse de diez a veinte veces. El examen se realiza de la siguiente manera:

1. Mezcle bien el especimen.
2. Ponga un volumen fijo (10, 12, ó 15 mL) de orina en un tubo de centrífuga graduado.
3. Centrifugue a 1500 rpm o aproximadamente 80 G por 5 minutos.
4. Extraiga el sobrenadante por decantación cuidadosa o aspiración hasta un volumen fijo: 1ml y 0.4 mL, son los más comunes. Resuspenda el sedimento golpeando suavemente en el fondo del tubo.
5. Ponga una gota el sedimento resuspendido en un área de una lámina estandarizada.
6. Examine con bajo poder (100x) y luz atenuada. Ajuste el enfoque fino permanentemente mientras se explora al azar el área cubierta. Durante la revisión evalúe el especimen en busca de células epiteliales transicionales y escamosas, cristales, moco, bacterias, levaduras y artefactos. Elabore el reporte de acuerdo a los protocolos del laboratorio. La identificación posterior de cilindros, células epiteliales renales, eritrocitos y leucocitos debe ser refinada empleando el objetivo de alto poder.
7. Examine, al menos, diez campos empleando luz tenue. Asegúrese de examinar los bordes porque a menudo los cilindros se encuentran a lo largo de los bordes del cubre objeto. Los cristales anormales, cuando están presentes, deben contarse con el objetivo de bajo poder. Una bacteriuria visible en bajo poder debe ser reportada, por lo menos, con 2+.
8. Examine, al menos, diez campos con alto poder (440x) y reporte con valores numéricos eritrocitos, leucocitos, y células del epitelio tubular renal.
9. Reporte todos los conteos (promedio de 10 campos) y evalúe cualitativamente de acuerdo a la terminología estandarizada.

Microscopía de campo claro con tinciones supravitales.

El detalle celular se realiza en sedimentos teñidos.[refs\(2192\)](#) Es frecuente el uso de un colorante de cristal violeta-safranina O para la evaluación rápida de ciertos elementos celulares.²⁷

Reactivo (Tinción de Sternheimer-Malbin)

Solución 1	Cristal violeta	3.0 g
	Etanol (95%)	20.0 mL
	Oxalato de amonio	0.8 g
	Agua destilada	80.0 mL
Solución 2	Safranina O	1.0 g
	Etanol (95%)	40.0 mL
	Agua destilada	400.0 mL

Mezclar y filtrar 3 partes de la solución 1 con 97 partes de la solución 2. La mezcla debe ser clarificada por filtración cada 2 semanas y descartarse después de 3 meses. Separadas y a temperatura ambiente, las soluciones 1 y 2 son estables indefinidamente. Con orinas altamente alcalinas, el colorante puede precipitar.



Procedimiento.

1. Añadir una o dos gotas de colorante violeta-safranina O a, aproximadamente, 1 mL de sedimento de orina precentrifugado y concentrado a ese volumen.
2. Mezclar con una pipeta y poner una gota de esta suspensión en una laminilla.

Microscopio de fases e interferencia.

Muchos laboratorios de uroanálisis recomiendan el uso de la microscopía de contraste de fases para una mejor detección de los elementos formados más translúcidos del sedimento urinario. Los cilindros hialinos, moco, y bacterias pueden escapar a la detección empleando la microscopía convencional, no teñida, bajo campo claro. La microscopía de contraste de fases tiene la ventaja de endurecer los contornos inclusive de los elementos más efímeros, haciendo más sencilla su **detección**.²⁴ Siempre se logra un detalle morfológico mejor de los elementos formados (notablemente en cilindros y células) con el uso de un microscopio de contraste de interferencias.

Métodos que emplean una laminilla estandarizada.

Kova (ICL Scientific, Fountain Valley, California), Count-10 y Count 6 (V-Tech, Palm desert, California), y Urisystem (Fisher Scientific, Pittsburgh) ofrecen procedimientos estandarizados completos que son técnicamente más precisos, reproducibles, y seguros que los métodos convencionales por microscopía de campo claro.^{ref(2193)} La Tabla 57-10 muestra una comparación de esos sistemas estandarizados para la microscopía del uroanálisis. Todas esas laminillas estandarizadas son superiores a las laminillas de vidrio convencionales.

Algunos laboratorios continúan empleando los hemocitómetros para cuantificar los elementos del sedimento de orina. Kessons y cols.^{ref(2194)} proporcionan evidencias de que las cámaras para conteo son más precisas para detectar anomalías del sedimento que los métodos convencionales de conteo de células en campos de alto poder.

Estación de trabajo semiautomatizada para uroanálisis

Un instrumento automatizado para uroanálisis, el Yellow IRIS (International Remote Imaging Systems Chastworth, California) combina la microscopía automatizada, un lector de tiras, y un módulo para gravedad específica. Esta tecnología puede ofrecer resultados más exactos que los sistemas manuales estandarizados, cuando hay un alto volumen de muestras y muy bajas concentraciones de elementos en el sedimento urinario.^{ref(2195)} Los métodos manuales parecen ser más sensibles para detectar cilindros.^{ref(2196)}

Citocentrifugación y tinción de Papanicolaou combinados.

Se ha recomendado una técnica que combina la citocentrifugación y la coloración de Papanicolaou para una valoración más exacta del sedimento de orina. Este método más especializado brinda una forma sencilla, reproducible y semicuantitativa para identificar los elementos del sedimento urinario. Con este método, los cilindros celulares, células mononucleares, fragmentos de tejido, y células neoplásicas pueden ser claramente identificados. Aunque no se encuentra rutinariamente en los laboratorios, la aceptación de este método está creciendo.^{refs(2197)}

Cristales

Los cristales urinarios son vistos comúnmente (Figs. 57-1 a 57-5). Usualmente los cristales



no están presentes en orinas frescas recién obtenidas y en general, la formación de los cristales es considerada como un artefacto del sistema de recolección. Los cristales se forman cuando varios constituyentes químicos llegan a saturarse o sufren un cambio en su solubilidad, cuando la orina es almacenada a temperaturas más bajas. Ciertas sustancias químicas, como la albúmina, previenen la cristalización. Cuando la orina se calienta a 37°C, la mayoría de los cristales desaparecen. Aquellos cristales que todavía permanecen, tienen importancia diagnóstica, cuando se correlacionan con síntomas clínicos.

Los tipos de cristales urinarios dependen del pH de la orina fresca. La Tabla 57-11 muestra los tipos más comunes, las propiedades, y la importancia clínica de varios cristales urinarios. La cistina, ácido úrico, leucina, y tirosina son los cristales de mayor importancia diagnóstica y por tanto deben ser identificados. Debido a la limitada relevancia clínica de los cristales, algunos laboratoristas están de acuerdo en que no debe desperdiciarse tiempo en su identificación específica. La formación de muchos cristales está inducida por varios medicamentos y su importancia clínica no es clara aún.

Organismos.

En un espécimen de orina bien recolectado y procesado, la presencia de organismos es importante desde el punto de vista clínico. Se reportan, frecuentemente, bacterias, hongos, parásitos, y células infectadas con virus. Los organismos vistos en un espécimen de orina son microscópicamente reconocibles como estructuras intra o extracelulares.[ref\(2198\)](#) Con la microscopía de campo claro se detectan fácilmente bacterias, hongos y parásitos. La detección de bacterias intracelulares fagocitadas y hongos, organismos de *Toxoplasma*, y cuerpos de inclusión viral, usualmente requieren procedimientos citológicos.

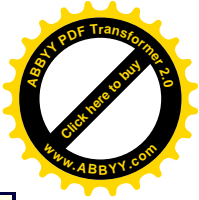
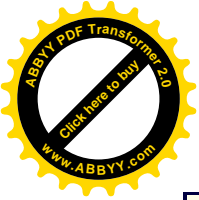
La identificación exacta de los organismos ayuda en el diagnóstico clínico diferencial de infecciones del sistema urinario. Las preparaciones coloreadas son importantes en la evaluación de organismos, identificación de células inflamatorias asociadas, en la valoración de la exfoliación epitelial, y en la formación de cilindros renales con el fin de identificar su localización.[ref\(2199\)](#) Se deben emplear técnicas microbiológicas para confirmar y clasificar completamente algunos organismos urinarios.

Bacterias.

La orina de individuos normales es estéril y no contiene bacterias. Algunas bacterias pueden estar presentes por contaminación durante la recolección o por almacenamiento prolongado. Se puede determinar una concentración de menos de 10³ bacterias/mL, cuando se han visto bacterias en un espécimen de orina centrifugado pero no en el espécimen sin centrifugar. La presencia de bacterias en un espécimen sin centrifugar indica que hay una concentración mayor de 10³ bacterias/mL. La presencia de 10⁵ bacterias/ml o más sugiere una infección de tracto urinario. Este número corresponde a 10 o más bacterias por campo de alto poder. La identificación de bacterias, cocos o bacilos puede hacerse por microscopía de campo claro o por contraste de fases. Ocasionalmente hay dificultad en diferenciar bacterias de cristales amorfos.

Hongos

Las infecciones del tracto urinario (ITU) producidas por hongos son comunes en pacientes diabéticos, en aquellos que toman medicamentos desde el nacimiento, o en aquellos



que han recibido terapia intensiva con antibióticos o terapia inmunosupresora. En la mayoría de las ITUs de pacientes no inmunocomprometidos, se ha observado un patrón inflamatorio asociado.

Candida albicans es el hongo más común, identificándose como levadura o micelio (Fig. 57-6). En general, la apariencia de gemación de levadura indica que el hongo ha coexistido con el huésped, mientras que la forma miceliar aparece durante la invasión al tejido. Las levaduras de *Candida albicans* son altamente refráctiles y miden de 3 a 5 μm . Suelen ser confundidas con eritrocitos (7 μm). A diferencia de los eritrocitos, las levaduras no son lisadas por ácidos.

Parásitos

La presencia de parásitos en la orina indica contaminación fecal o vaginal. La *Trichomona vaginalis*, un flagelado, es el parásito que más comúnmente se observa en la orina. La incidencia de este tipo de parásito en mujeres es muy alta pudiendo producir vaginitis severa. En el hombre, el parásito causa una uretritis asintomática. Debido a la motilidad de este organismo oval, la microscopía de campo claro es empleada como la forma más sencilla y rápida de identificación. Los tricomónidos inmóviles pueden ser confundidas con leucocitos o células epiteliales.

Se han encontrado huevos de helmintos (*Enterovius vermicularis*) en la orina de niños por contaminación fecal. Morfológicamente un huevo de helminto está rodeado por una cápsula con dos capas, transparente y delgada, pudiéndose ver, enrollado dentro de ella, un embrión. En la orina, también pueden encontrarse huevos de trematodos, *Schistosoma haematobium* (encontrado en el norte de Africa) y *Schistosoma mansoni* (encontrado en Centro América).

Células infectadas de virus

Con una frecuencia cada vez mayor, se encuentran cambios celulares inducidos por virus en el sedimento de orina de pacientes inmunocomprometidos. Se deben emplear técnicas citológicas para asegurar la identificación de citomegalovirus, herpes simplex y *Polyomavirus*, los cuales producen células con inclusiones intranucleares diagnósticas, siendo estas las infecciones virales más comunes del sistema urinario. Las células de inclusión viral deben distinguirse de las células de inclusión provenientes de fuentes no virales, como la exposición a metales pesados (plomo y cadmio) y de cambios celulares degenerativos no específicos. En los textos de citología de orina se puede encontrar una descripción detallada de las células de inclusión viral.

Células

Una parte importante del análisis de la orina es la identificación y evaluación de las células. Normalmente las células más comunes en la orina incluyen unos cuantos leucocitos, eritrocitos, y células epiteliales de origen renal o del tracto urinario inferior. Todas las células de importancia patológica deben ser cuantificadas normalmente por examen del campo con el objetivo de alto poder.

Eritrocitos.

Una orina normal, examinada con objetivo de alto aumento, no debe contener más de unos cuantos eritrocitos.^{refs(2200)} Estas células aparecen en la orina después de lesiones vasculares o trastornos del riñón o del tracto urinario inferior. La presencia de eritrocitos

acompañada de cilindros hemáticos o eritrocitos dismórficos (Fig. 57-7) es sugestiva de sangrado del parénquima renal o del glomérulo. La detección urinaria de eritrocitos dismórficos, especialmente acantocitos, es un marcador morfológico importante de sangrado glomerular o tubular.[refs\(2201\)](#) Su cuantificación ayuda en el diagnóstico y manejo del paciente. Cuando se examinen orinas de mujeres, es importante evitar la contaminación con sangre menstrual.

Los eritrocitos miden, aproximadamente, 7 μm de diámetro, tienen forma de discos biconcavos los cuales aparecen de un color amarillo pálido cuando se examinan bajo microscopía de campo claro (Fig. 57-8). En orinas hipertónicas aparecen pequeños y dentados, mientras que en orinas hipotónicas aparecen más grandes e hinchados. Cuando los eritrocitos han permanecido en la orina por un tiempo considerable, la hemoglobina puede escapar de las células.

En ocasiones, las tiras reactivas pueden detectar hemoglobina en ausencia de eritrocitos en el examen microscópico. Una posible explicación de esta discrepancia es la presencia de orinas alcalinas o hipotónicas, ambas pueden causar lisis de los eritrocitos. En ausencia de estas condiciones, es muy sugestivo que el pigmento que aparece en la orina (puede ser hemoglobina o mioglobina) se origine por filtración desde la sangre.

Leucocitos (Fig. 57-8)

La velocidad de excreción normal de eritrocitos en la orina es de 1 leucocito por cada 3 campos con objetivo de alto aumento, 3000 células/mL, o más de 200,000 células/hora. Un elevado número de leucocitos (piuria) está asociado a numerosos procesos inflamatorios e infecciosos del tracto urinario. La mayoría de los leucocitos vistos por microscopía de campo claro son neutrófilos segmentados. La identificación de linfocitos, células plasmáticas, y eosinófilos requiere de coloraciones especiales.

Little[ref\(2202\)](#) ha mostrado que una velocidad de excreción en exceso de 400,000 células/hora siempre indica una infección del tracto urinario. Esta velocidad corresponde a más de 10 neutrófilos por campo de alto poder. Los pacientes con infecciones activas del tracto urinario superior tienen, frecuentemente, más de 50 neutrófilos por campo de alto poder o una velocidad de excreción de leucocitos que excede 2 o aún 3 millones/hora.

Células del epitelio tubular renal (Figs. 57-9 a 57-11)

En el nefrón están alineados varios tipos de células del epitelio tubular renal y las células enfermas o viejas están constantemente siendo arrojadas a la orina. Aunque ellas representan la exfoliación renal real, la presencia de más de dos células del epitelio tubular renal por campo de alto aumento indican daño o lesión activa de los túbulos renales.

Hay grandes dificultades en la identificación precisa de las células de los túbulos renales, especialmente, para diferenciarlas de las células mononucleares comúnmente encontradas en la orina. Por microscopía de campo claro, las células tubulares renales son poligonales y de tamaño ligeramente menor que los leucocitos. Se requieren técnicas citológicas para la identificación exacta de los diferentes tipos de células tubulares renales (ductos convolucionados versus ductos colectores), de capas o fragmentos.[refs\(2203\)](#)

Cuerpos grasos ovales (Fig. 57-12)

Los cuerpos grasos ovales son células del epitelio tubular renal que están llenas de

lípidos absorbidos o que han sufrido cambios degenerativos celulares. A menudo los cuerpos grasos ovales son asociados con proteinuria y lipiduria y son característicos del síndrome nefrótico y diabetes mellitus.

Células epiteliales de transición (Fig. 57-13)

En la orina normal se pueden encontrar unas pocas células de transición (uroteliales). Un gran número de células transicionales puede indicar procesos inflamatorios de la vejiga, cateterización o estados patológicos malignos.

Por microscopía de campo claro, las células transicionales aparecen redondas u ovaladas, miden de 40 a 60 μm , y tienen un núcleo localizado centralmente. Los bordes citoplásmicos de esas células aparecen engrosados y rígidos. Cuando los núcleos de las células transicionales llegan a agrandarse o a tornarse irregulares, se recomienda emplear técnicas citológicas con el fin de detectar enfermedades malignas del sistema urinario.

Células epiteliales escamosas (Fig. 57-14)

Las células epiteliales escamosas se alinean en la porción distal del tracto urinario inferior y en el tracto genital femenino. Las células escamosas son las células más grandes encontradas en la orina. Tienen un citoplasma grande y plano con un núcleo pequeño. Frecuentemente, una o más hileras de esas células pueden plegarse. La presencia de células escamosas en la orina usualmente indica contaminación (vaginal, en mujeres y uretral en hombres no circuncidados) o metaplasia escamosa de la vejiga, y representan el tipo menos importante de células epiteliales encontradas en la orina.

Fragmentos de tejidos en la orina (Fig. 57-15)

En la orina, pueden observarse algunos conglomerados o fragmentos de material de apariencia sólida. Debido a su gran tamaño, este material es identificado en la inspección inicial de la orina. Es de color generalmente blanco o bronceado. Es muy importante establecer la identidad de este material para un diagnóstico seguro. Esto implica transferirlo a un fijador apropiado con el fin de preservarlo para una evaluación citológica o histológica. La necrosis papilar renal o los tumores de la vejiga son las entidades más frecuentemente responsables de desprender grandes fragmentos de tejido en la orina.

Espermatozoides.

Los espermatozoides pueden ser fácilmente reconocidos en la orina de un hombre después de la eyaculación o en la orina de una mujer por contaminación vaginal después del coito. Su identificación es de limitada importancia clínica y la presencia de espermatozoides, generalmente, no es reportada.

Cilindros renales (Figs. 57-16 a 57-21)

Los cilindros renales (urinarios) son estructuras cilíndricas que se organizan en el nefrón y su importancia proviene de su localización. Están formados por uromucoide (mucoproteína de Tamm-Horsfall), que está siempre presente en la orina, usualmente en suspensión. Este uromucoide es producido por las células del epitelio tubular renal de la sección ascendente del asa de Henle. Los cilindros se forman como consecuencia del estancamiento de la orina y de la precipitación del uromucoide. El incremento en la concentración de proteínas, sales, y un pH urinario bajo son algunos de los factores que contribuyen a su formación. Debido a que la

precipitación de esta proteína depende de la concentración y composición de la orina, los cilindros se forman más fácilmente en la porción distal del nefrón y en los ductos colectores del riñón, donde la orina es más concentrada. En pacientes con proteína de Bence Jones (mieloma múltiple), los cilindros pueden formarse en los túbulos convolucionados proximales.

Estas formaciones cilíndricas presentes en la orina reflejan las formas (largas o cortas) y diámetros (delgados y gruesos) de los lúmenes de los túbulos renales en donde se formaron. Su número y propiedades cuantificables aportan valiosos indicios sobre la naturaleza de la enfermedad del parénquima renal.

Microscópicamente, los cilindros se caracterizan por la apariencia de su matriz (hialina, granular, cérea), por los constituyentes celulares (eritrocitos, leucocitos, o células del epitelio tubular renal) o por el tipo de material particulado embebido en la matriz (gránulos finos, gruesos o fibrina).

La identificación exacta de los cilindros, especialmente de los tipos celulares, es difícil cuando se hace en preparaciones húmedas no coloreadas visualizadas en microscopios bajo la luz directa o campo claro. Se necesita un microscopista hábil para evitar las interpretaciones erróneas. La visualización de los cilindros mejora con el empleo de microscopios con contraste de fases, de filtros de contraste o coloraciones especiales. La técnica de citocentrifugación de Papanicolaou es el mejor método para asegurar la identificación de cilindros en orina en pacientes con enfermedad renal.

Para propósitos diagnósticos de enfermedad renal, los cilindros se han clasificado como *fisiológicos* o *patológicos*. En la Tabla 57-12 se encuentra una lista de los tipos, propiedades, e importancia clínica más comunes de los cilindros.

Grasas.

Las grasas se encuentran en la orina de pacientes quienes han presentado embolismo graso después de lesiones severas con aplastamiento óseo, degeneración grasa del riñón o síndrome nefrótico. La grasa aparecerá en la superficie de la orina recolectada en la última parte de la micción. En el sedimento urinario se pueden encontrar células epiteliales vacuoladas. La identificación de las gotas de grasa se facilita empleando coloraciones especiales para grasa como Oil Red O o Sudán III.

Citología de Orina

Los laboratoristas que trabajan el uroanálisis deben ser capaces de reconocer células mononucleares anormales, sugestivas de malignidad. Esto debe ser referido para citología de orina. Holmquist ha promovido el uso de coloraciones supravitales para la detección de células malignas y ha sugerido la función del laboratorio de uroanálisis en el tamizaje del cáncer.

Cálculos (Litiasis)

Los cálculos urinarios son precipitaciones, concreciones, o cristaloides embebidos en una sustancia de moco y proteínas y pueden también encontrarse bacterias y células epiteliales incluidas en estas formaciones. Aunque la causa de su formación es aún controvertida, la



detección e identificación de los cálculos es muy importante en el diagnóstico de las afecciones del sistema urinario. La formación de cálculos en el riñón o en el tracto urinario inferior puede ser fuente de hematuria severa, causar daños anatómicos serios, y dolor muy agudo en el paciente. El conocimiento de la composición específica de un cálculo expulsado o extraído quirúrgicamente puede ayudar al médico en el tratamiento efectivo de la litiasis y a prevenir su formación futura.

El análisis de los constituyentes químicos de los cálculos es un procedimiento complejo de laboratorio. Los cálculos urinarios están usualmente compuestos de oxalato de calcio, oxalato de calcio mezclado con fosfato de calcio, fosfato de amonio y magnesio, ácido úrico, o cistina. La mayoría de los laboratorios refieren sus especímenes para análisis de cálculos a laboratorios especializados.

Hallazgos Urinarios en Enfermedades Renales Comunes y del Tracto Urinario Inferior

Hay numerosos estados y enfermedades primarias y secundarias del riñón y del tracto urinario inferior. Un diagnóstico preciso de las enfermedades del sistema urinario requiere la correlación de hallazgos anormales en la orina con la historia clínica del paciente, su examen físico, signos y síntomas, prueba de función renal, y otros datos de laboratorio. Para ser clasificado como anormal, un sedimento urinario debe cumplir por lo menos uno de los siguientes criterios:

1. Más de cinco eritrocitos o leucocitos por campo de alto aumento (400X).
2. Más de dos células tubulares por campo de alto aumento (400X).
3. Más de tres cilindros hialinos, más de un cilindro granuloso, o la presencia de cualquier cilindro patológico por campo de bajo aumento (100X).
4. Más de diez bacterias por campo de alto aumento (400X).
5. Presencia de hongos, parásitos, o células de inclusión.
6. Presencia de cristales patológicos(cistina) o un gran número de cristales no patológicos (como el ácido úrico).

El Tabla 57-13 muestra un resumen de las anormalidades encontradas en el uroanálisis en enfermedades renales comunes y en enfermedades del tracto urinario inferior, así como una breve revisión de los hallazgos en los exámenes macroscópico y microscópico.

Un Enfoque Coordinado para el Uroanálisis

El uroanálisis continua siendo uno de los procedimientos de laboratorio clínico mas comúnmente requeridos y solicitados.[ref\(2204\)](#) Los laboratorios dedicados al análisis de la orina deben definir nuevas responsabilidades tanto en el proceso de los métodos rápidos y rutinarios como en el proceso e interpretación de los análisis especializados para los que se requiere mayor inversión de tiempo.[ref\(2205\)](#)

La estandarización del examen de orina realizado bajo microscopía de luz en campo claro, empleando tiras húmedas rápidas y tecnología actualizada, ofrece un buen programa de calidad para el análisis de especímenes provenientes de individuos asintomáticos. Sí los

pacientes sintomáticos van a recibir un análisis de orina más integral, se requiere de una evaluación más definitiva y la realización de procedimientos confirmatorios.

La Fig. 57-22 describe un enfoque coordinado que puede seguirse en el proceso del examen de orina. El uso adecuado de este enfoque, exige que el clínico y el tecnólogo encargado del análisis de la orina entiendan claramente las funciones y posibilidades que ofrecen tanto el laboratorio de análisis básico como el especializado, el cual posibilita un examen más integral del sedimento urinario. Después de la recolección de la orina y de su análisis macroscópico, el médico o el laboratorio deben diferenciar los resultados provenientes de los pacientes sintomáticos y de los asintomáticos. Debe hacerse énfasis en la capacidad del tecnólogo responsable del uroanálisis para reconocer los resultados que requieren seguimiento y análisis adicionales. Este enfoque coordinado representa un sistema flexible a través del cual las responsabilidades técnicas pueden ser compartidas, integrando al sistema procedimientos confirmatorios especiales (Fig. 57-22). La comunicación entre los médicos, los analistas del laboratorio y el médico director es esencial para aclarar resultados no concluyentes y restablecer la credibilidad en el examen de la orina.

Control de Calidad

Para asegurar la exactitud de los resultados del uroanálisis es crucial establecer un programa efectivo de control de calidad. Debe implementarse un programa de aseguramiento de la calidad que cubra todos los aspectos del uroanálisis y que sea similar al de las otras áreas del laboratorio clínico involucradas con el fin de lograr resultados confiables.[ref\(2206\)](#)

Existen preparaciones disponibles comercialmente de control de calidad para gravedad específica y pruebas de la tira reactiva. Estas preparaciones pueden ser presentadas en forma de tabletas, tiras, líquidos o liofilizados. Hocltge y Erts[ref\(2207\)](#) describen una experiencia de tres años, empleando un control de orina sintética preparado en su laboratorio. Actualmente no existe ninguna preparación comercial ideal para elementos del sedimento urinario. El control de calidad en la evaluación del sedimento debe enfocarse a las técnicas y políticas estandarizadas.

La Tabla 57-14 sugiere un esquema de control de calidad. Es importante que los reactivos sean fechados cuando son recibidos en el laboratorio y usados antes de su expiración. Las soluciones de orina control son estables si se almacenan refrigeradas, en recipientes con cierres bien ajustados y protegidas de la luz.[ref\(2208\)](#) Deben llevarse registros de los números de lote que se reciben. Se debe mantener y revisar anualmente un manual que contenga instrucciones de operación y documentación del mantenimiento de los equipos. Debe enfatizarse en la importancia de un programa de educación continua para tecnólogos y el uso de referencias actualizadas.[ref\(2209\)](#)

Referencias

1. Bonnardeau A, Sommerville P, Kaye M: A study on the reliability of dipstick urinalysis, *Clin Nephrol* 41:167-172, 1994.
2. Kennedy TJ, McConnell JD, Thall ER: Urine dipstick vs. microscopic urinalysis in the evaluation of abdominal trauma, *J Trauma* 28:615-617, 1988.



3. Free AH, Free MA: Rapid convenience urine tests: their use and misuse, *Lab Med* 9:9-17, 1978.
4. Schumann GB: *Urine sediment examination*, Baltimore, 1980, Williams & Wilkins.
5. Fairley KF, Birch DF: Microscopic urinalysis in glomerulonephritis, *Kidney Int* 44:9-12, 1993.
6. Eggenberger DL, King C, Gaudette LE, et al: Cytodiagnostic urinalysis: three year experience with a new laboratory test, *Am J Clin Pathol* 91:202-206, 1989.
7. Marcussen N, Schumann JL, Schumann GB, et al: Analysis of cytodiagnostic urinalysis findings in 77 patients with concurrent renal biopsies, *Am J Kidney Dis* 20:618-628, 1992.
8. Schumann GB, Schumann JL, Marcussen N: *Cytodiagnostic urinalysis of renal and lower urinary tract disorders*, New York, 1995, Igaku-Shoin.
9. Bradley M, Schumann GB, Ward PCJ: Examination of urine. In Henry JB, editor: *Todd-Sanford clinical diagnosis by laboratory methods*, ed 16, Philadelphia, 1979, Saunders.
10. Tentative Committee for Clinical Laboratory Standards: *Routine urinalysis and collection, transportation and preservation of urine specimen*, Villanova, Penna., 1992, 12(26) GP16-T.
11. Kunin CM: *Detection, prevention and management of urinary tract infections*, ed 2, Philadelphia, 1974, Lea & Febiger.
12. Cohen HT, Spiegel DM: Air-exposed urine dipsticks give false-positive results for glucose and false-negative results for blood, *Am J Clin Pathol* 96:398-400, 1991.
13. Zweiss MH, Jackson A: Ascorbic acid interference in reagent-strip reactions for assay of urinary glucose and hemoglobin, *Clin Chem* 32:674-677, 1986.
14. Schweitzer SC, Schumann JL, Schumann GB: Quality assurance guidelines for the urinalysis laboratory, *J Med Technol* 2:567-572, 1986.
15. Monte-Verde D, Nosanchuk JS: The sensitivity and specificity of nitrite testing for bacteriuria, *Lab Med* 12:755-757, 1981.
16. Shenoy UA: Current assessment of microhematuria and leukocyturia, *Clin Lab Med* 5:317-329, 1985.
17. Kusumi RK, Grover PJ, Kunin CM: Rapid detection of pyuria by leukocyte esterase activity, *JAMA* 245:1653-1655, 1981.
18. Gillenwater NY: Detection of urinary leukocytes by Chemstrip-L, *J Urol* 125:383-384, 1981.
19. Avent J, Schumann GB, Vars L: Comparison of the Chemstrip leukocyte test with a standardized Papanicolaou-stained urine sediment evaluation, *Lab Med* 14:163-166, 1983.
20. Race GJ, White MG: *Basic urinalysis*, Hagerstown, Md., 1979, Harper & Row.
21. Schumann GB, Greenberg NF: Usefulness of microscopic urinalysis as a screening procedure: a preliminary report, *Am J Clin Pathol* 71:452-456, 1979.
22. Ferris JA: Comparison and standardization of the urine microscopic examination, *Lab Med* 14:659-662, 1983.
23. Schumann GB, Tebbs RD: Comparison of slides used for standardized routine microscopic urinalysis, *J Med Technol* 3:54-58, 1986.
24. Winkel P, Statland BE, Jörgensen K: Urine microscopy: an ill-defined method examined by a multifactorial technique, *Clin Chem* 20:436-439, 1974.
25. Schumann GB, Weiss MA: *Atlas of renal and urinary tract cytology and its histopathologic bases*, Philadelphia, 1981, Lippincott.
26. Holmquist N: Detection of cancer with urinary sediment, *J Urol* 123:188-189, 1980.
27. Sternheimer R: A supravital cytodiagnostic stain for urinary sediment, *JAMA* 231:826-832, 1975.
28. Brody LH, Webster MC, Kark RM: Identification of elements of urinary sediment with phase contrast, *JAMA* 206:1777-1781, 1969.
29. Haber MH: Interference contrast microscopy for identification of urinary sediment, *Am J Clin Pathol* 57:316-319, 1972.
30. Haber MH: *Urinary sediment: a textbook atlas*, Chicago, 1981, American Society of Clinical Pathologists.



31. Kesson AM, Talbott JM, Gyory AZ: Microscopic examination of urine, *Lancet* 2:809-812, 1978.
32. Roe CE, Carlson DA, Daigneault RW, Statland BE: Evaluation of the Yellow IRIS\T: an automated method for urinalysis, *Am J Clin Pathol* 86:661-665, 1986.
33. Elin RJ, Hosseini JM, Kestner J, et al: Comparison of automated and manual methods for urinalysis, *Am J Clin Pathol* 86:731-737, 1986.
34. Bard RH: The significance of asymptomatic microhematuria in women and its economic implications: a ten-year study, *Arch Intern Med* 148:2629-2632, 1988.
35. Thal SM, DeBellis CC, Iverson SA, Schumann GB: Comparison of dysmorphic erythrocytes with other urinary sediment parameters of renal bleeding, *Am J Clin Pathol* 86:784-787, 1986.
36. Kuster S, Ritz E: Fragmentocytes in the diagnosis of renal hematuria -observations in the 19th century, *Nephrol Dial Transplant* 9:569-570, 1994.
37. Stapleton FB: Morphology of urinary red blood cells: a simple guide in localizing the site of hematuria, *Pediatr Clin North Am* 34:561-569, 1987.
38. Kohler H, Wandel E, Brunck B: Acanthocyturia\Ma characteristic marker for glomerular bleeding, *Kidney Int* 40:115-120, 1991.
39. Little PJ: A comparison of the urinary white cell concentration with the white cell excretion rate, *Br J Urol* 36:360-363, 1964.
40. Mandel N: Urinary tract calculi, *Lab Med* 17:449-458, 1986.
41. Schumann GB, Schumann JL, Schweitzer S: Coordinated approach to the urine sediment examination, *Lab Management* 1:45-48, 1983.
42. Schweitzer SC, Schumann JL, Schumann GB: A model for educating future urine technologists, *J Med Technol* 2:251-255, 1986.

Tablas

Table 57-1.

Table 57-2.

Tabla 57-3. Causas comunes de orina opaca o turbia.

Causas	Métodos de aclaramiento	Comentarios
Químicas		
Ureatos	Solubles a 60 °C o álcali	Sedimento rosado
Fosfatos y carbonatos	Solubles en ácido diluido	
Cristales	Ver las características específicas de solubilidad (Tabla 57-11)	
Mucus	—	Viscosa



Medios de contraste radiográficos	Solubles en hidróxido de sodio al 10%	
Lípidos	Solubles en éter	Opalescente
Quilo	Solubles en éter	Lechosa
Células		
Bacterias	Centrifugación	Olor desagradable
Hongos	Centrifugación	Olor a sudor
Eritrocitos	Centrifugación	Roja, ahumada
Leucocitos	Centrifugación	
Epitelio	Centrifugación	
Espermatozoides	Centrifugación	

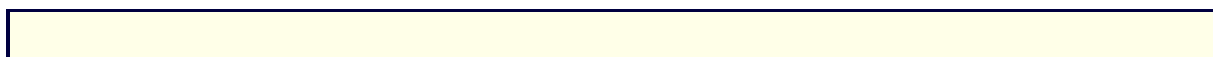
Tabla 57-4. Estandarización de soluciones para gravedad específica.

Solución	Gravedad específica
Agua destilada	1.000
Cloruro de sodio al 3%	1.015 +/- 0.001
Cloruro de sodio al 5%	1.022 +/- 0.001
Sucrosa al 9%	1.034 +/- 0.001

Tabla 57-5. Composición de la orina de individuos normales.

Constituyente	Valor
Albumina	< 15-30 mg/l
Calcio	100-240 mg/24h
Creatinina	1.2-1.8 mg/24h
Glucosa	<300 mg/l
Cetonas	<50 mg/l
Osmolaridad	>600 mOsm/l
Fósforo	0.9-1.3 g/24h
Potasio	30-100 mEq/24h
pH	4.7-7.8
Sodio	85-250 mEq/24h
Gravedad específica	1.005-1.030
Bilirrubina total	(No detectada)
Proteínas totales	<150 mg/24h
Nitrógeno ureico	7-16 g/24h
Acido úrico	300-800 mg/24h
Urobilinógeno	<1 mg/l

Tabla 57-6. Sensibilidades prácticas de tiras reactivas comerciales.



Parámetros de la orina	Chemistrip*	N-Multistix +
pH	1 unidad de pH	1 unidad de pH
Proteínas	60 mg/l	50-200 mg/l
Glucosa	400 mg/l	750 mg/l
Cetonas	50 mg/l ácido acetoacético 400-700 mg/l acetona	90 mg/l ácido acetoacético 800-1400 mg/l acetona
Bilirrubina	5 mg/l	4-8 mg/l
Sangre	5 eritrocitos intactos/ ul o hemoglobina de 10 eritrocitos/ul	5-20 eritrocitos intactos/ul o hemoglobina de 5 eritrocitos/ul
Urobilinógeno	4 mg/l	2 mg/l
Nitritos	0.3 mg/l	0.6-1 mg/l
Esterasa (neutrófilos)	6-10 leucocitos/c400x	5-15 leucocitos/c400x
+ Ames, Inc, Division of Miles laboratories, Inc., Elkhart, Indiana		
* BMC/Biodinamics, Indianapolis, Indiana.		

Tabla 57-7. Análisis confirmatorios útiles.

Análisis	Análisis confirmatorio	Razón
Proteínas	Método del ácido sulfosalicílico (SSA)	Mayor especificidad Mayor sensibilidad
	Electroforesis de proteínas	Mayor especificidad
Cetonas	Acetest	Mayor especificidad Mayor sensibilidad Mayor estabilidad del color
Bilirrubina	Ictotest	Mayor sensibilidad

Bacteriuria	Cultivo	Identificación y cuantificación.
Células anormales cilindros	Exámen citológico	Mayor visualización Cuantificación.

Tabla 57-8. Estados clínicos comunes que producen orinas ácidas y alcalinas.

Orina ácida	Orina alcalina
Dieta proteica	Dieta con vegetales
Acidos metabólica y respiratoria	Vómito
Deshidratación	Acidosis tubular renal
Inanición	Amonio producido por ruptura de la urea por las bacterias
Metabolismo de grasas	Terapia con acetazolamida
Sueño	Dietas bajas en carbohidratos
Bacterias productoras de ácidos	Falla renal crónica

Tabla 57-9. Ensayos para proteinuria.

	Tira reactiva	Acido sulfosalicílico	Resultados
Sensibilidad	50-200 mg/l (albúmina)	100 mg/l (todas las proteínas)	
Uso combinado	Resultado negativo	Resultado negativo	No hay proteínas
	Resultado positivo	Resultado negativo	Nivel de proteínas clínicamente insignificante o resultado falso positivo del análisis de la tira.
	Resultado negativo	Resultado positivo	Proteína de Benc Jones, Proteínas de cadena pesada (se requiere confirmación con electroforesis) Interferencia por drogas (penicilina)
Constituyentes en orina que comunmente causan resultados falsos negativos y positivos.			
Turbidez en la orina	—	Falso positivo y negativo	
Medios de contraste rayos X	—	Falso positivo	
Tolbutamida (Orinasa)	—	Falso positivo	
Penicilina(dosis masivas)	—	Falso positivo	
Sulfisoxazol (Gantricin)	—	Falso positivo	



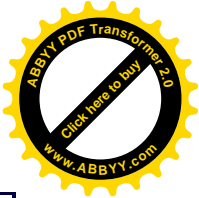
Orina alcalina altamente tamponada	Falso positivo	Falso negativo
Sales de amonio cuaternario	Falso positivo	—
Tolmetin sódico (Tolectin)	—	Falso positivo

Tabla 57-10. Principales características de los sistemas de láminas para uroanálisis.

	Convencional	Uni-Slide *	Kova +	Count -10 **
Volumen del sedimento de orina				
Cantidad promedio	1 gota	16 µl	6 µl	6 µl
Coefficiente de variación %		7%	6%	10%
Superficie para el examen microscópico				
Area total (mm ²)	484	90	32	36
Número de campos en 100X	144	25	9	12
Número de campos en 400X	2116	420	119	49
Número de planos focales antes del ajuste	1-2	1-2	1-2	3-4
Tipo de cubreobjeto	Vidrio	Vidrio	Plástico	Plástico
Costo por ensayo	7c	9c	9c	6c
Máximo número de ensayos por lámina	2	4	10	10
*Uni-Slide, Uri-System Slide distribuido by Fisher Scientific, Pittsburgh, as part of the Fisher brand Uri-System.				
+ Kova IV Slide, ICL Scientific, Fountain Valley, California.				
** Cont-10 Slide, V Tech, Inc, Palm Desert, California.				

Tabla 57-11. Cristales comunes en la orina.

Tipos	Acido	<u>pH de la orina</u>			Apariencia morfológica diagnóstica	Características solubilidad	Significado de clínico
		Alcalino	Neutro	Variable			
Uratos	x				Incoloros, amorfos, esféricos o con forma de aguja	Solubles en álcali o a 60 Co	Sanos
Acido úrico	x				De incoloros a amarillo, quemado, pleomórficos romboidales, como platos o rosetas de cuatro lados	Solubles en álcali	Sanos, quimioterapia, gota.
Carbonato de calcio				x	Esferas incoloras	Solubles en ácido acético	Sanos
Fosfatos (fosfatos triples)		x			Incoloros, prismas de tres a seis	Solubles en ácido acético	Sanos



			lados. Como "Cerradura de tumbas"		
Uratos de amonio	x		Pardos, "espina de manzana"	Solubles en ácido acético a 60 Co.	Sanos
Oxalato de calcio		x	Incoloros, con forma de octaedro o sobre con una envenamiento x dentro.	Solubles en ácido clorhídrico, diluido.	Sanos, con glicol
Cistina		xI	ncoloros, hexagonales, planos	Solubles en álcali.	Cistinosis
Colesterol		x	Incoloros, como platos planos con una muesca en una esquina.	Solubles en cloroformo y eter.	Daño renal
Tirosina		x	Amarillos a incoloros, con forma de agujas finas que se agrupan en roquetas o gavillas.	Solubles en álcali.	Daño hepático, amino-aciduria.
Leucina		x	Esferoides amarillos con estriaciones	Solubles en alcohol caliente	Daño hepático, amino-aciduria.
Bilirubina		x	Rojo quemado, amorfos, agujas, platos romboidales, o cubos.	Solubles en álcali.	Bilirrubinuria.
Sulfonamidas		x	Cubos, glóbulos o gavillas	Solubles en acetona	Terapia con anti-bióticos.

Table 57-12.

Table 57-13.

Tabla 57-14. Esquema sugerido de control de calidad en uroanálisis.

Areas chequeadas	Tiempo				Cuando se requiera
	Diaria	Semanal	Mensual	Semianual o anual	
Reactivos y otros					
Tiras reactivas		x			
Tabletas reactivas		x			
Patrones de proteínas				x	

Equipos					
Temperatura del refrigerador	x				
Temperatura del congelador	x				
Calibración del refractómetro	x	x			
Calibración del urinómetro	x	x			
Calibración del espectrofotómetro		x			
Mantenimiento del microscopio				x	
Termómetros		x			
Material de vidrio			x		
Mantenimiento de la centrífuga				x	
Educación					
Revisión del manual de laboratorio				x	
Prueba de eficiencia para tecnólogos		x			
Biblioteca al día				x	
Corealcciones clínicopatológicas					x

Figuras

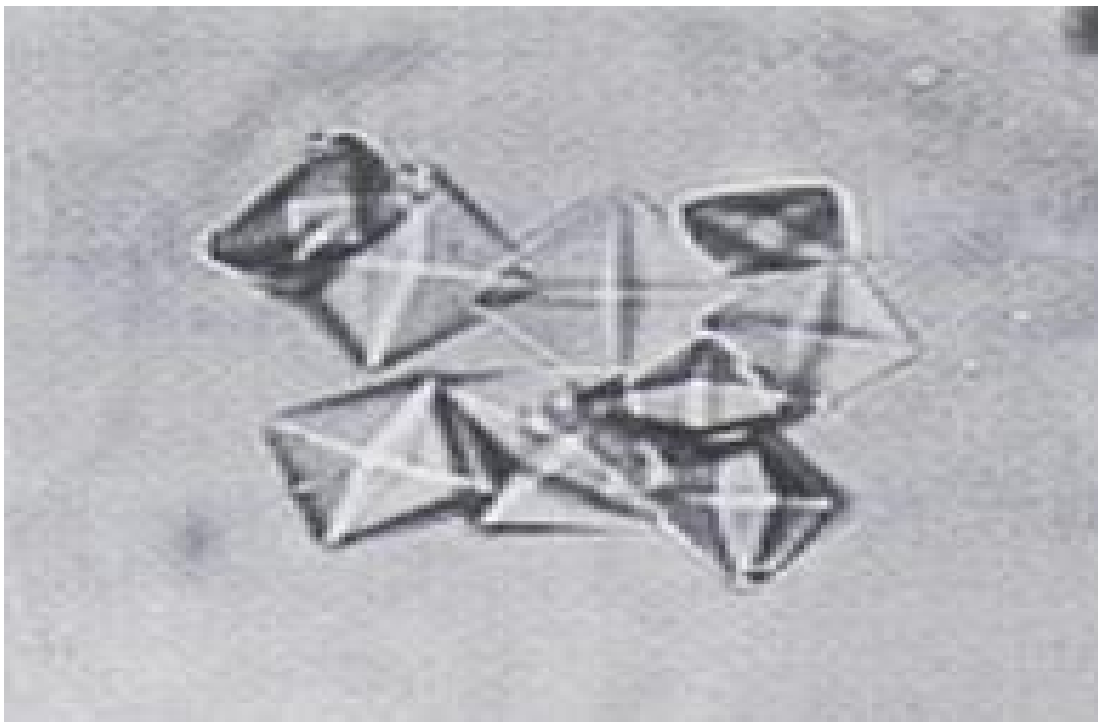


Figura 57-1 Cristales de ácido úrico. (Tinción de Papanicolaou, 400x) cilindro

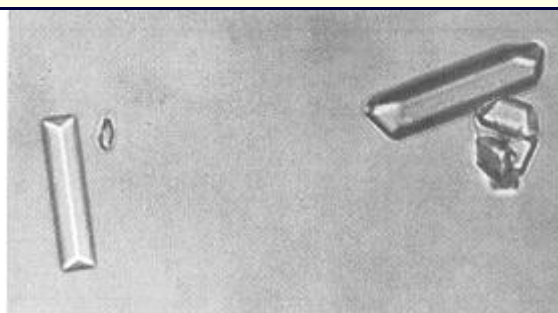


Figura 57-2 Cristales de trifosfatos. (Campo claro, 400x)

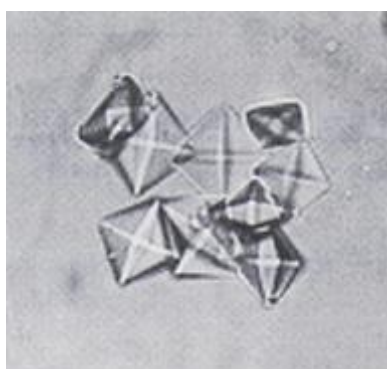


Figura 57-3 Cristales de oxalato de calcio. (Campo claro, 1000x)

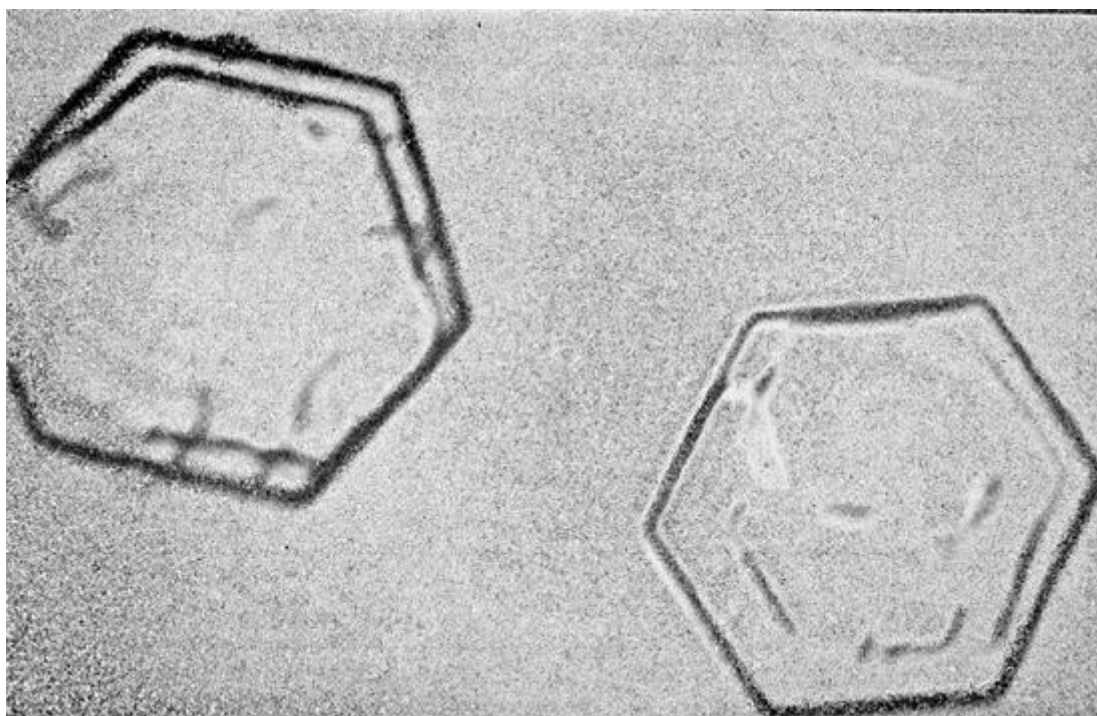


Figura 57-4 Cristales de cistina (campo claro, 2500x)

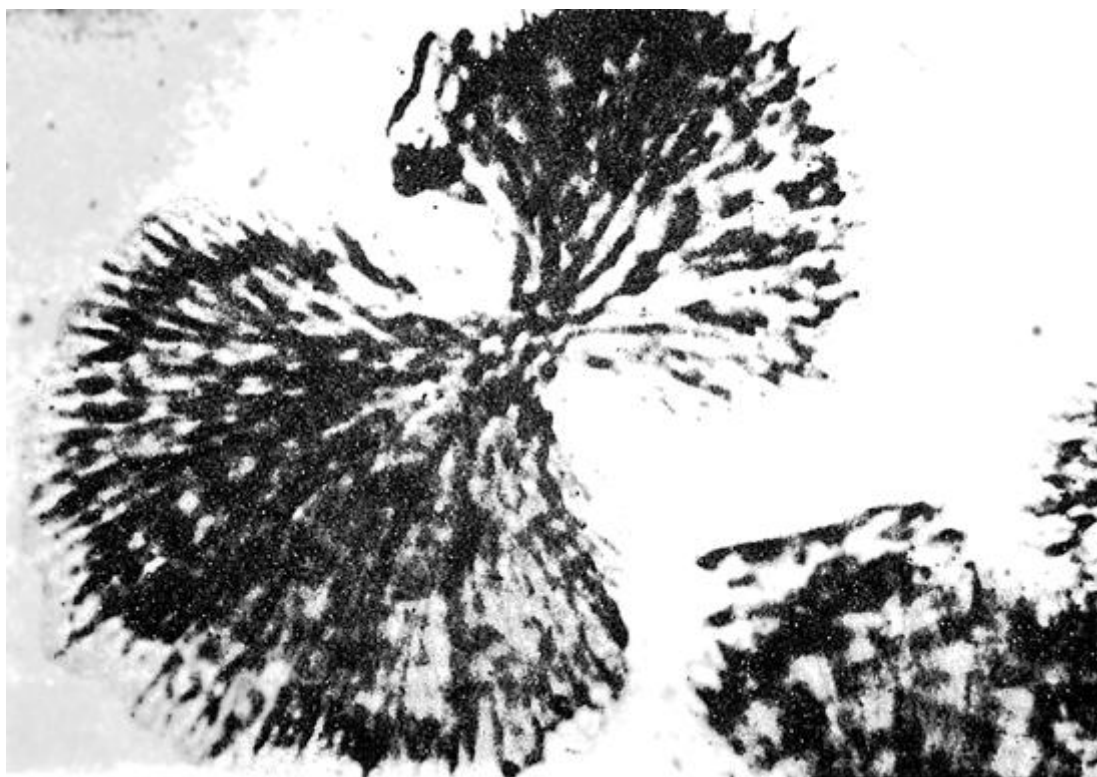


Figura 57-5 Cristales de sulfonamida. (Campo claro, 2500x)

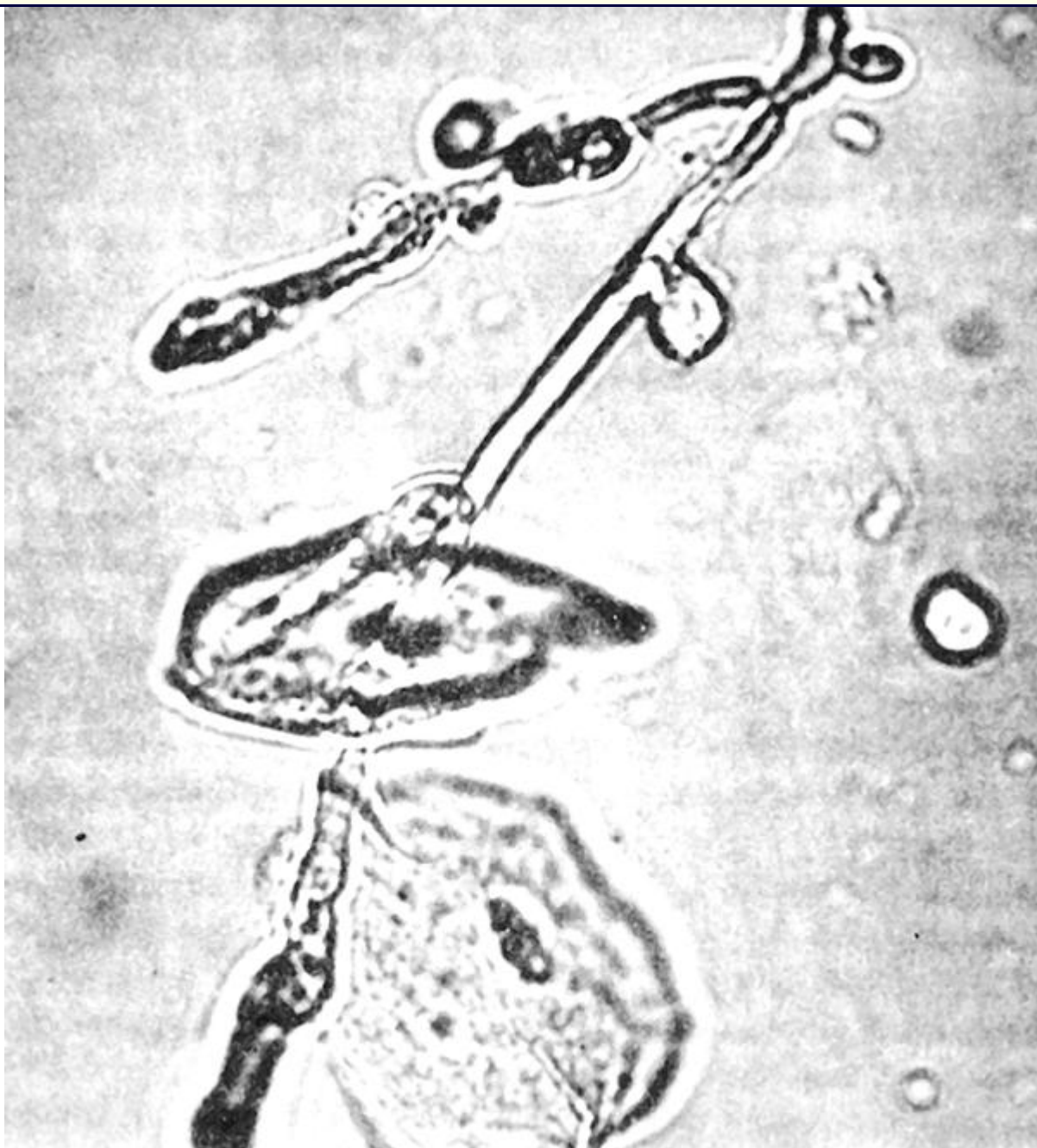


Figura 57-6 Hongos levaduras y micelios, probablemente una especie de *Candida*.
(Campo claro, 2500x)

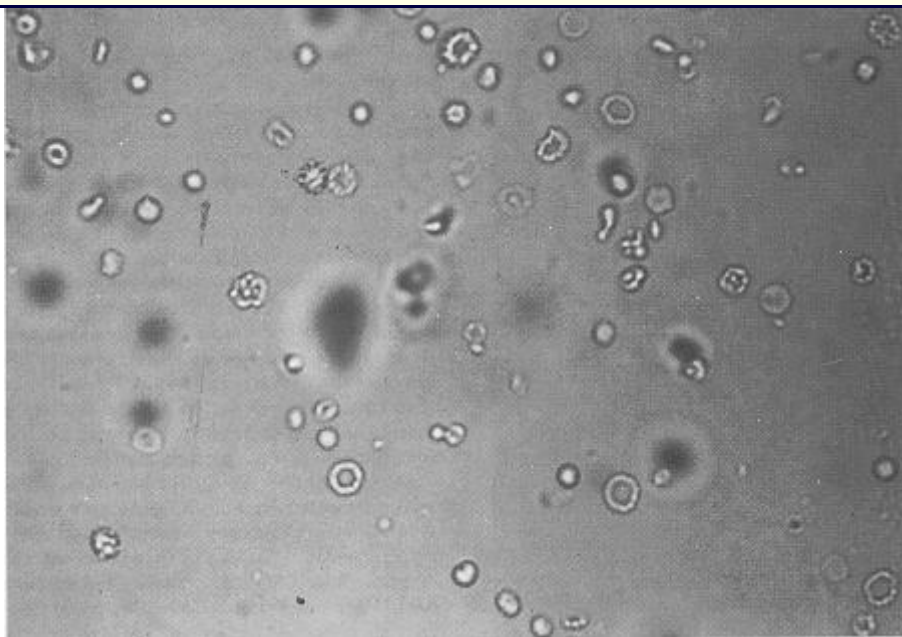


Figura 57-7 Eritrocitos dismórficos. (Campo claro, 400x)

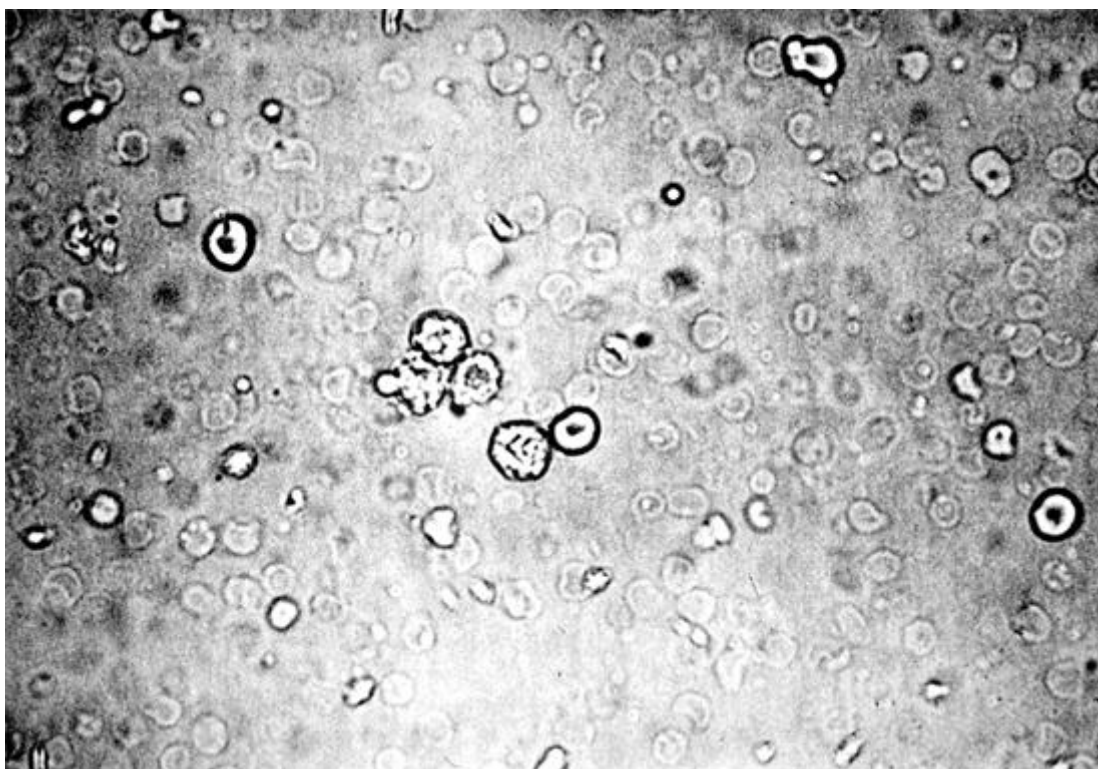


Figura 57-8 Eritrocitos y leucocitos. (Campo claro 400x)

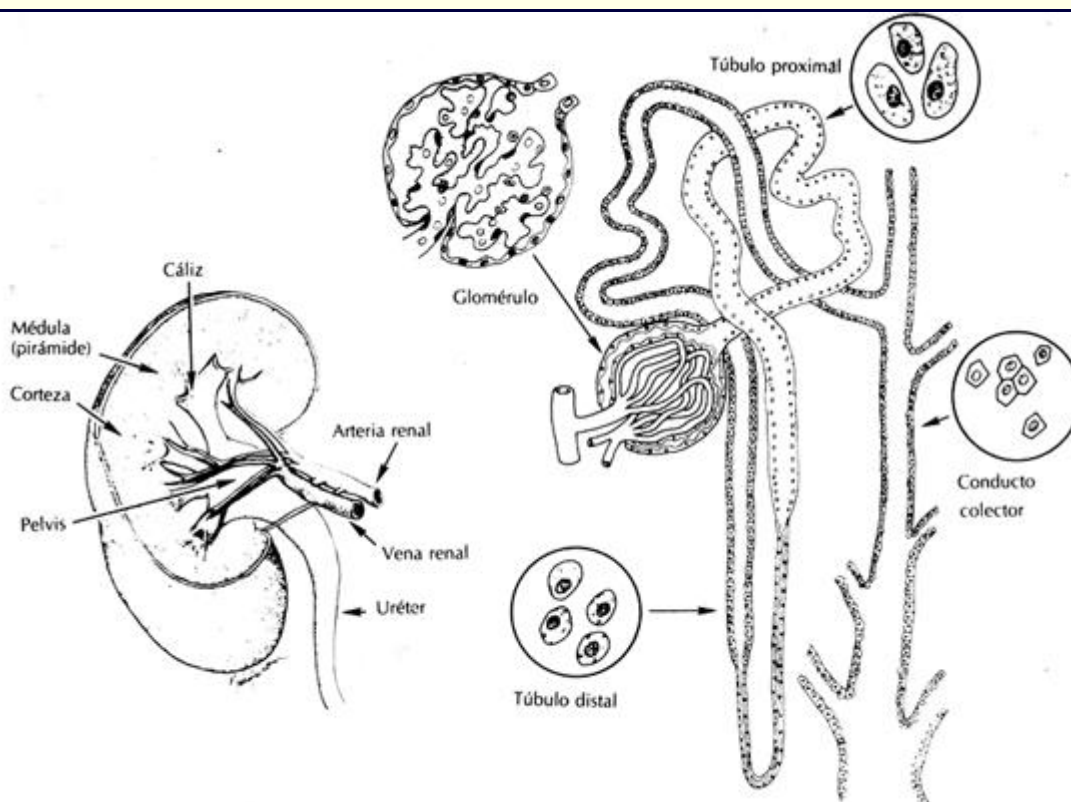


Figura 57-9 Localización de las células del epitelio tubular renal.

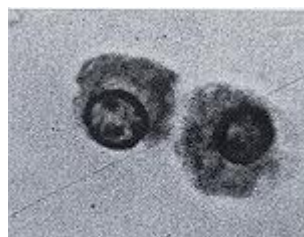


Figura 57-10

Células del epitelio tubular renal. (Campo claro, 1000x)

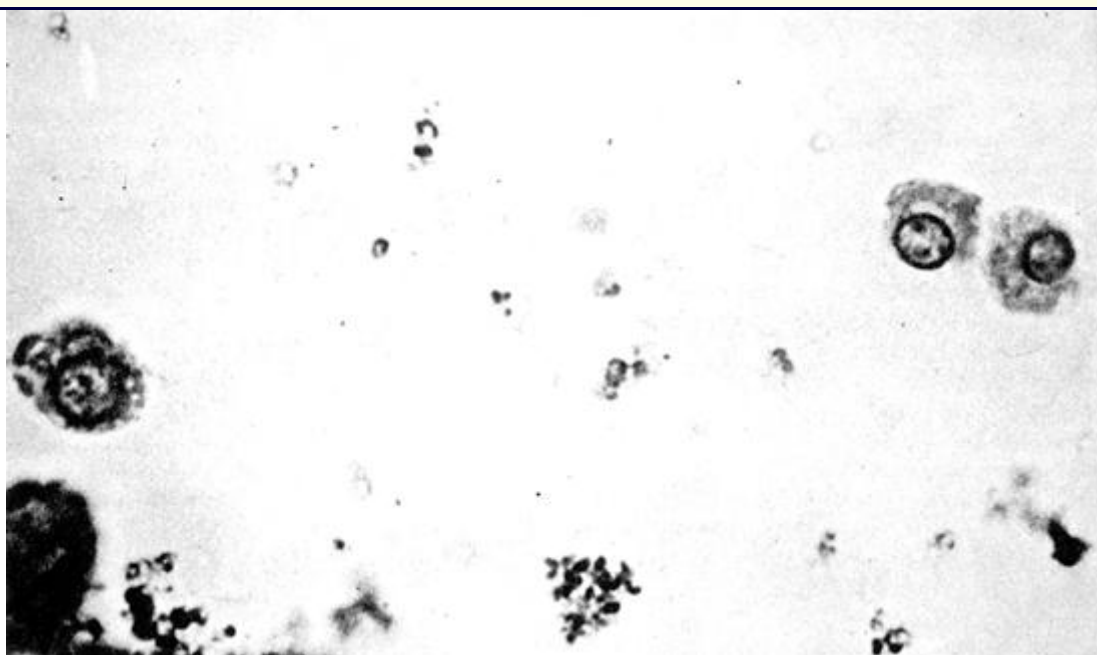


Figura 57-11 Células del epitelio tubular renal. (Tinción de Papanicolaou)



Figura 57-12

Cuerpos de grasa ovales. (Campo claro, 1250x)

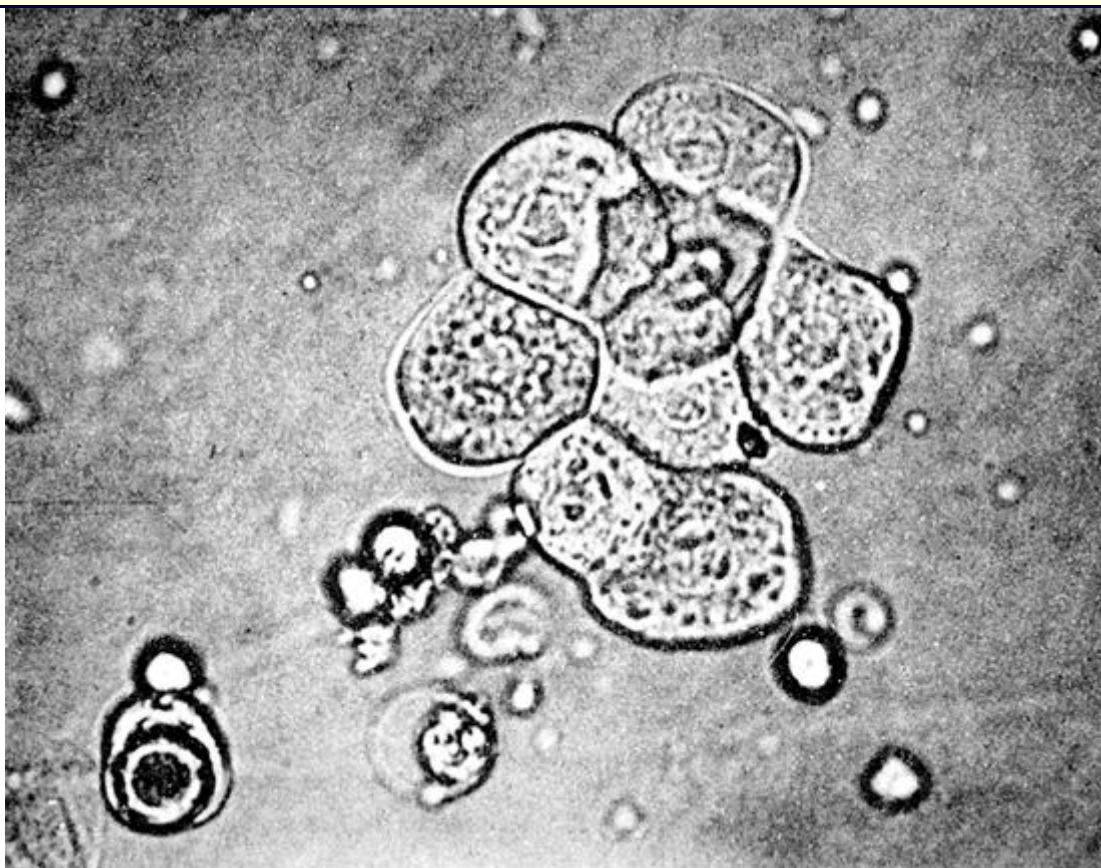


Figura 57-13 Células del epitelio transicional. (Campo claro, 1000x)

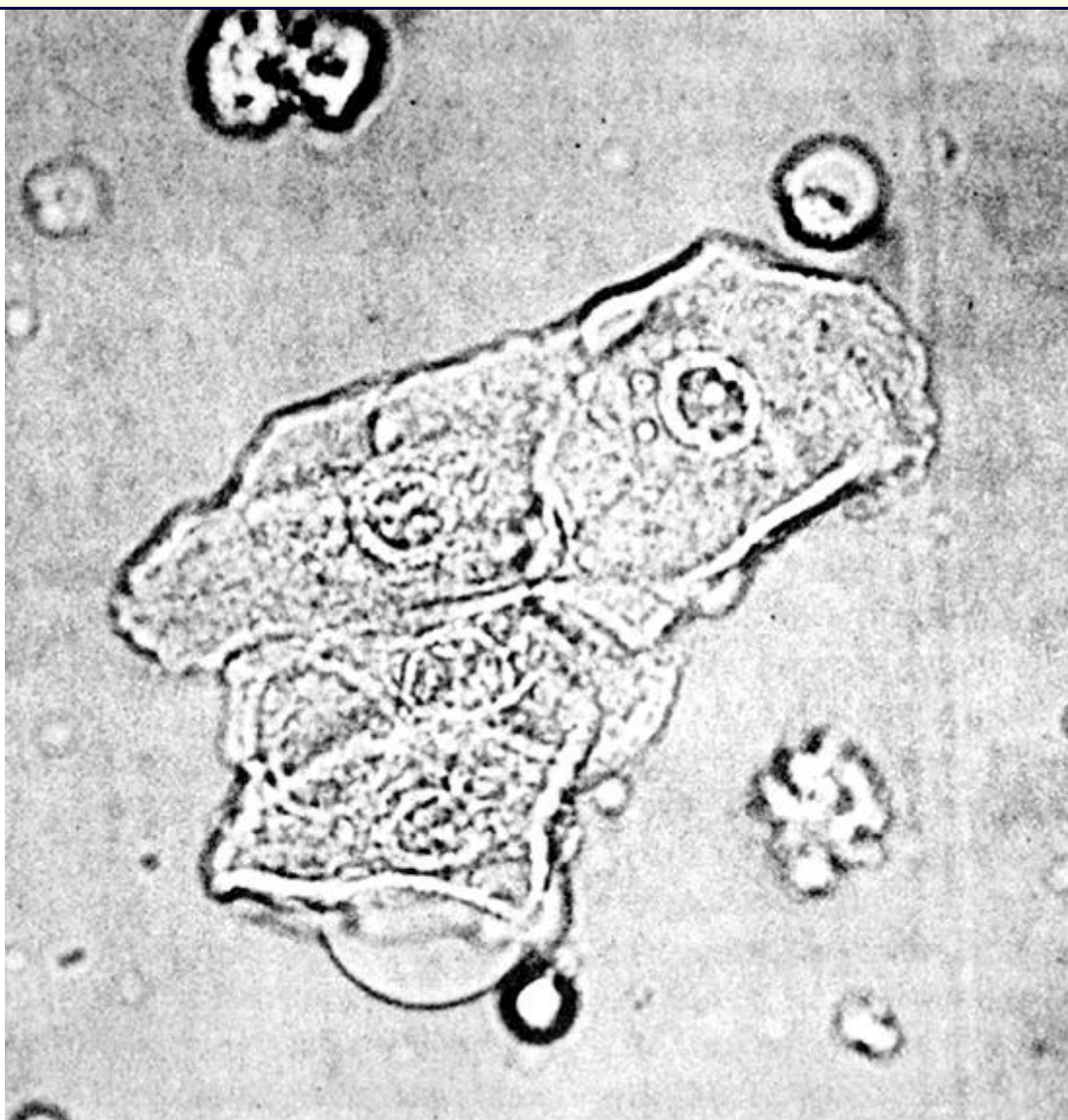


Figura 57-14 Células epiteliales escamosas. (Campo claro, 1000x)

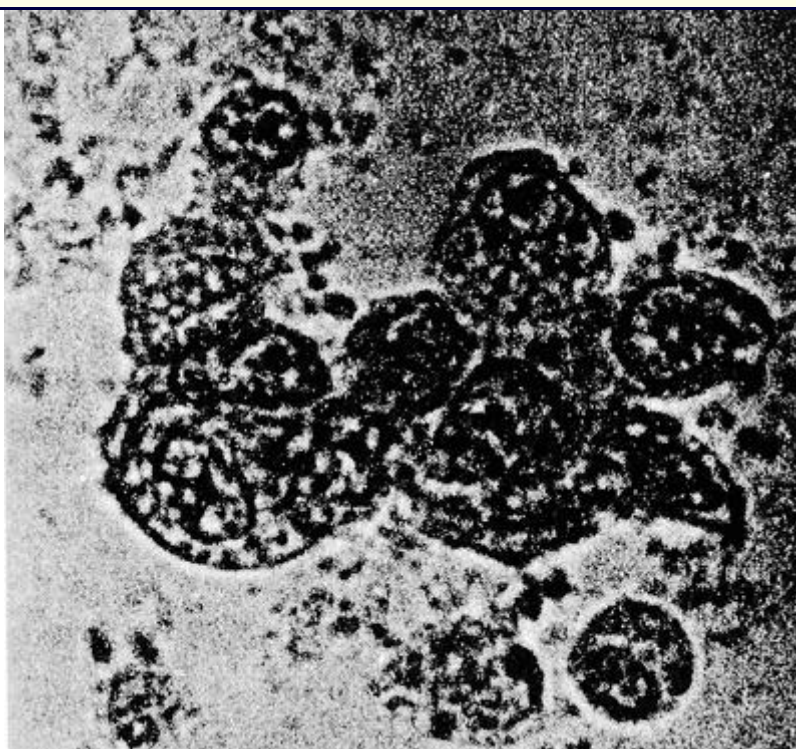


Figura 57-15 Fragmentos de tejido maligno en orina (campo claro, 1000x)

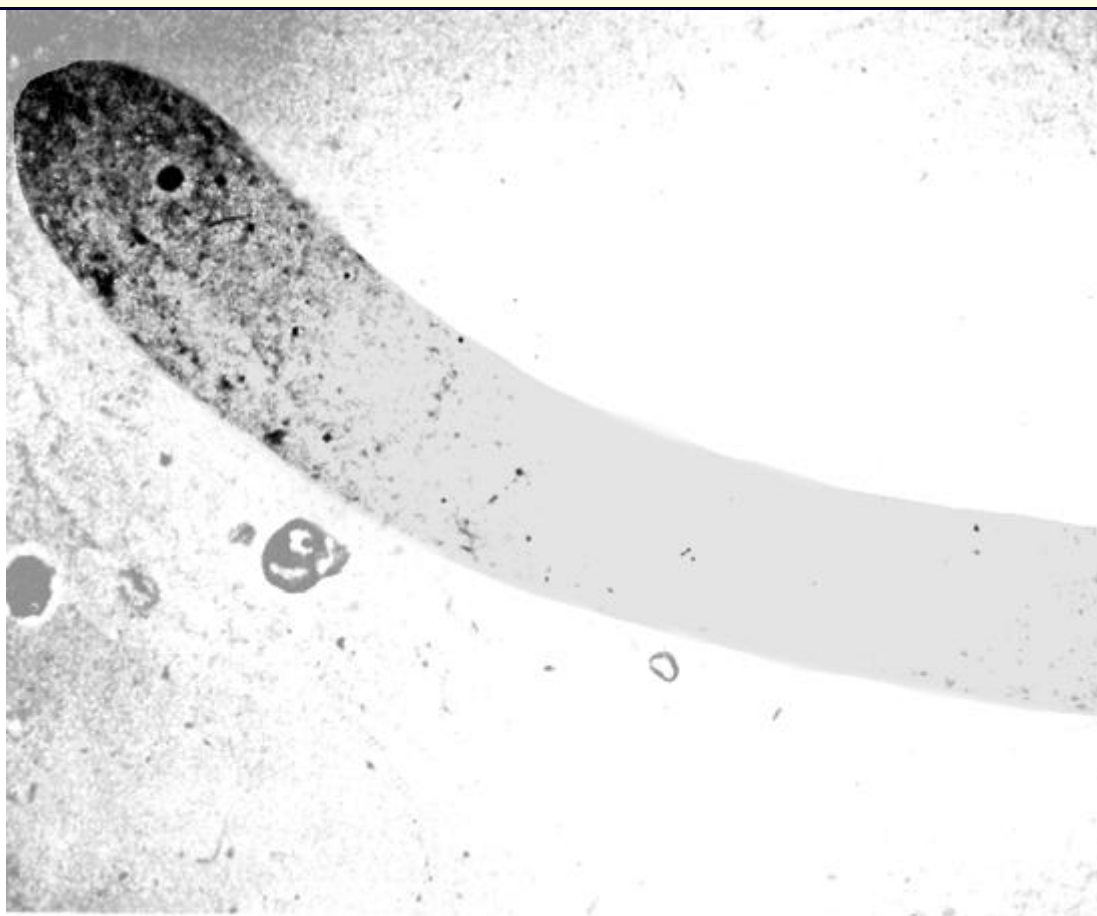


Figura 57-16 Cilindros hialinos. (Campo claro, 1000x)

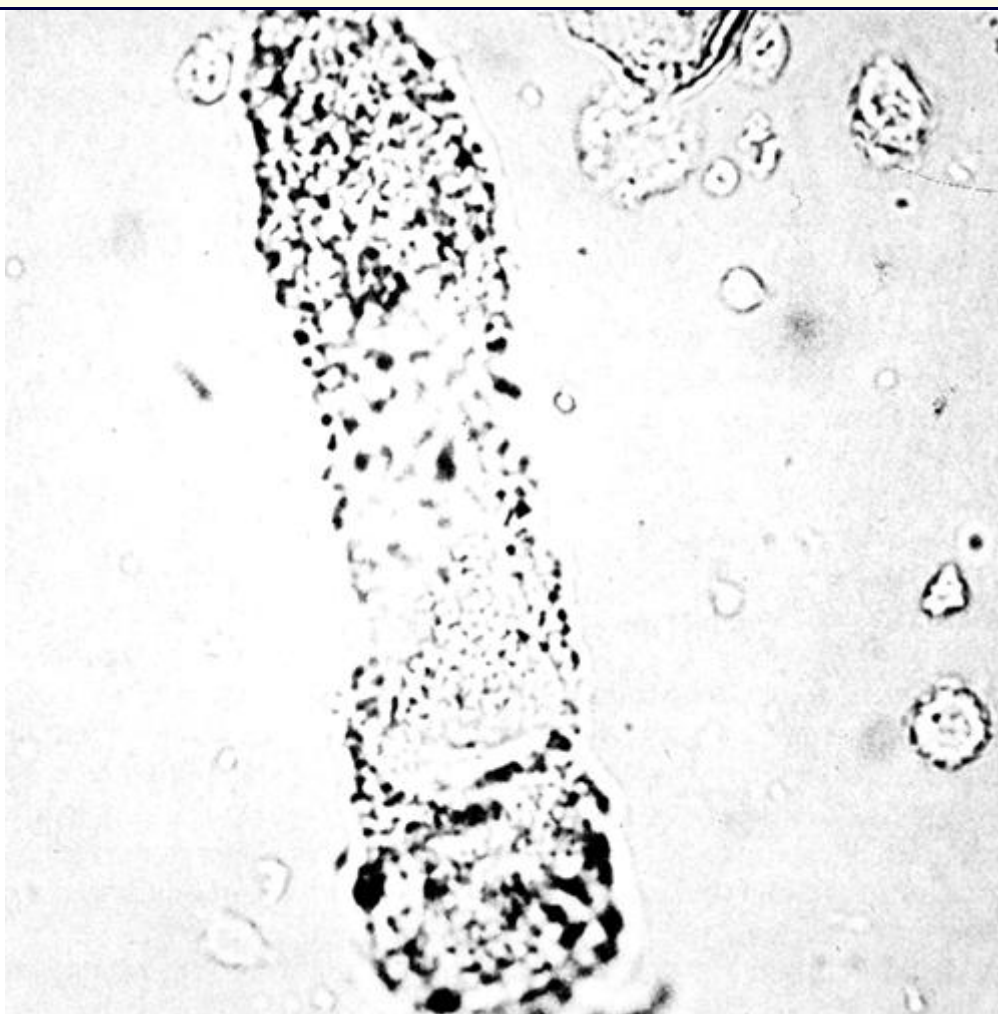


Figura 57-17 Cilindros granulares. (Campo claro, 1000x)

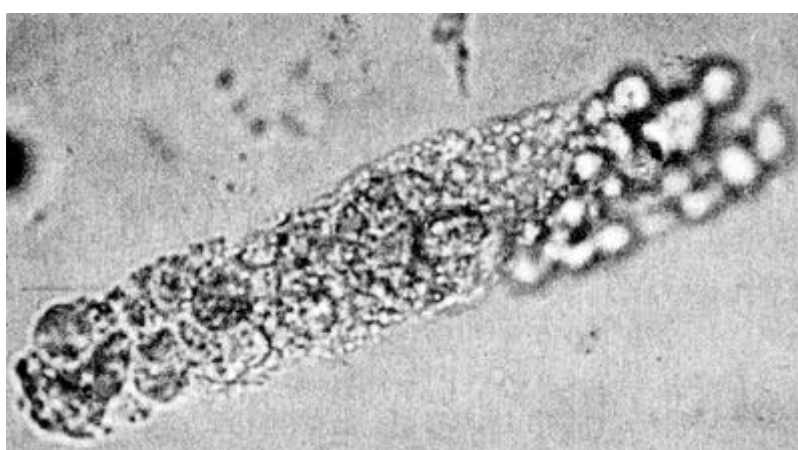


Figura 57-18 Cilindros de células tubulares renales. (Campo claro, 1000x)

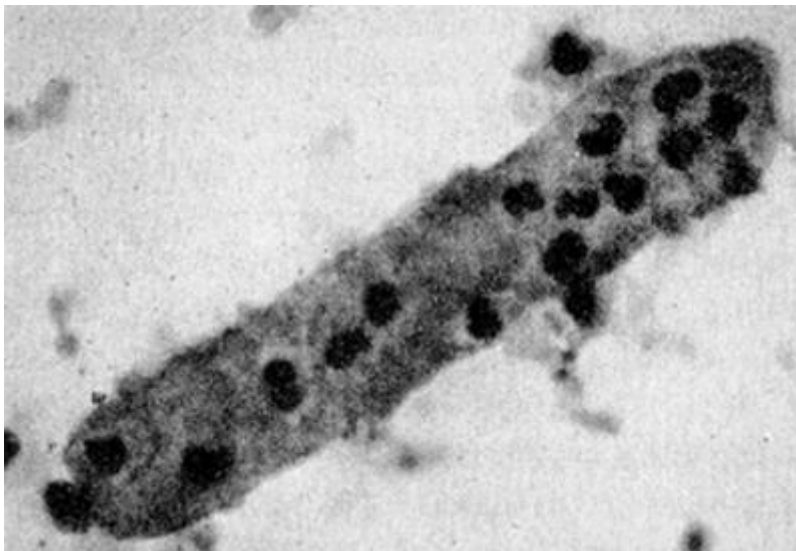


Figura 57-19 Cilindros de leucocitos. (Campo claro 400x)

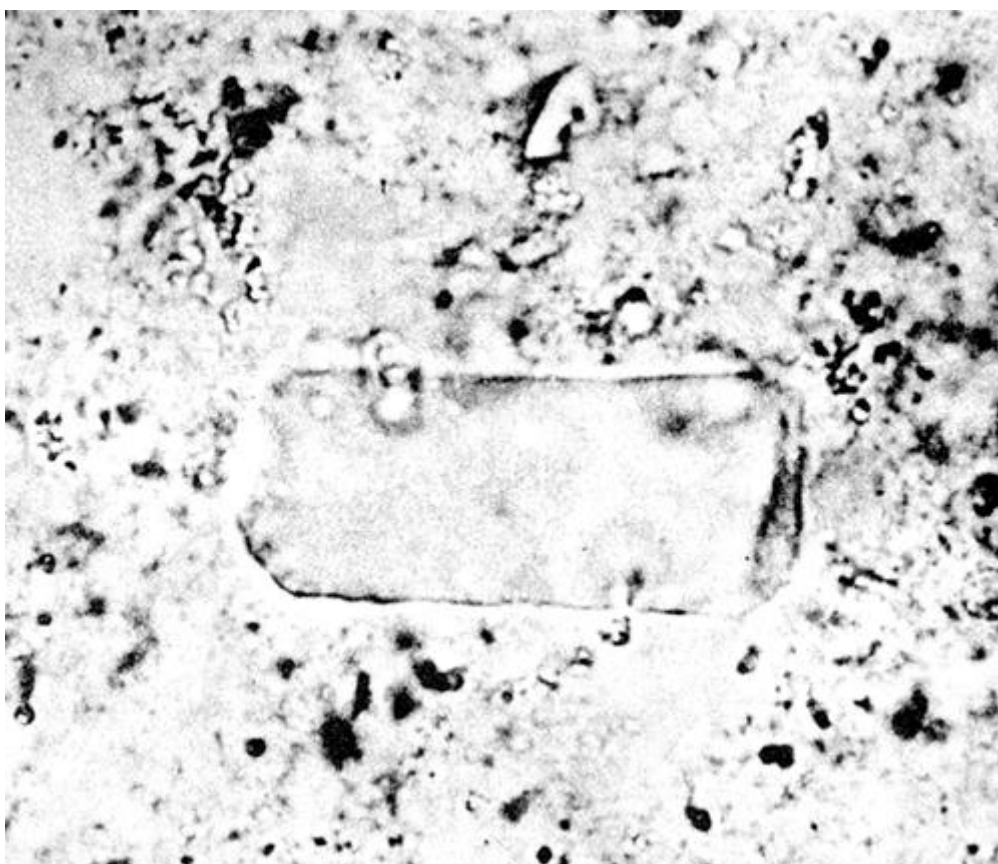


Figura 57-20 Cilindros céreos. (Campo claro, 1000x)

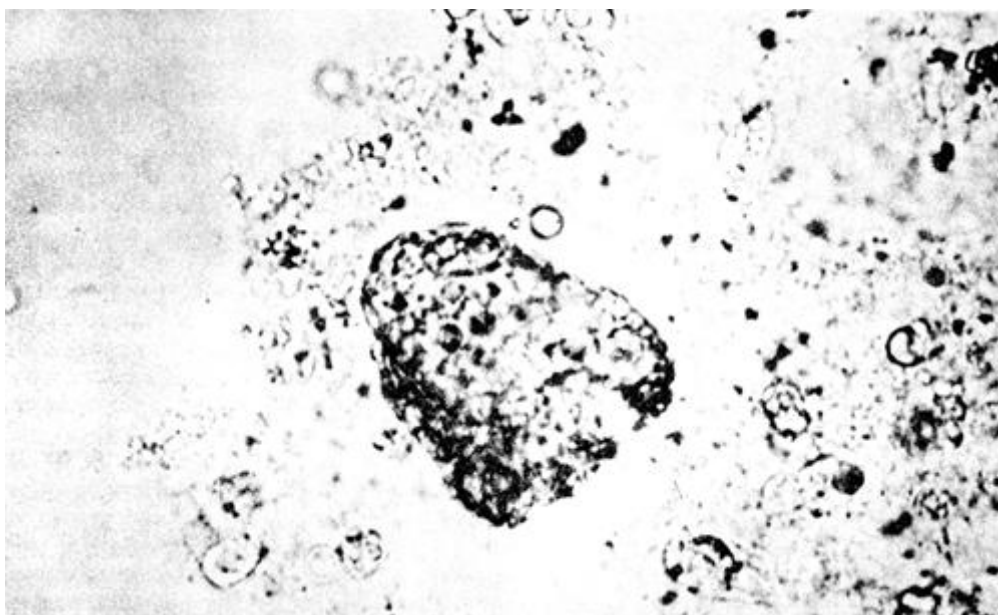


Figura 57-21 Cilindro ancho (Campo claro, 1000x)

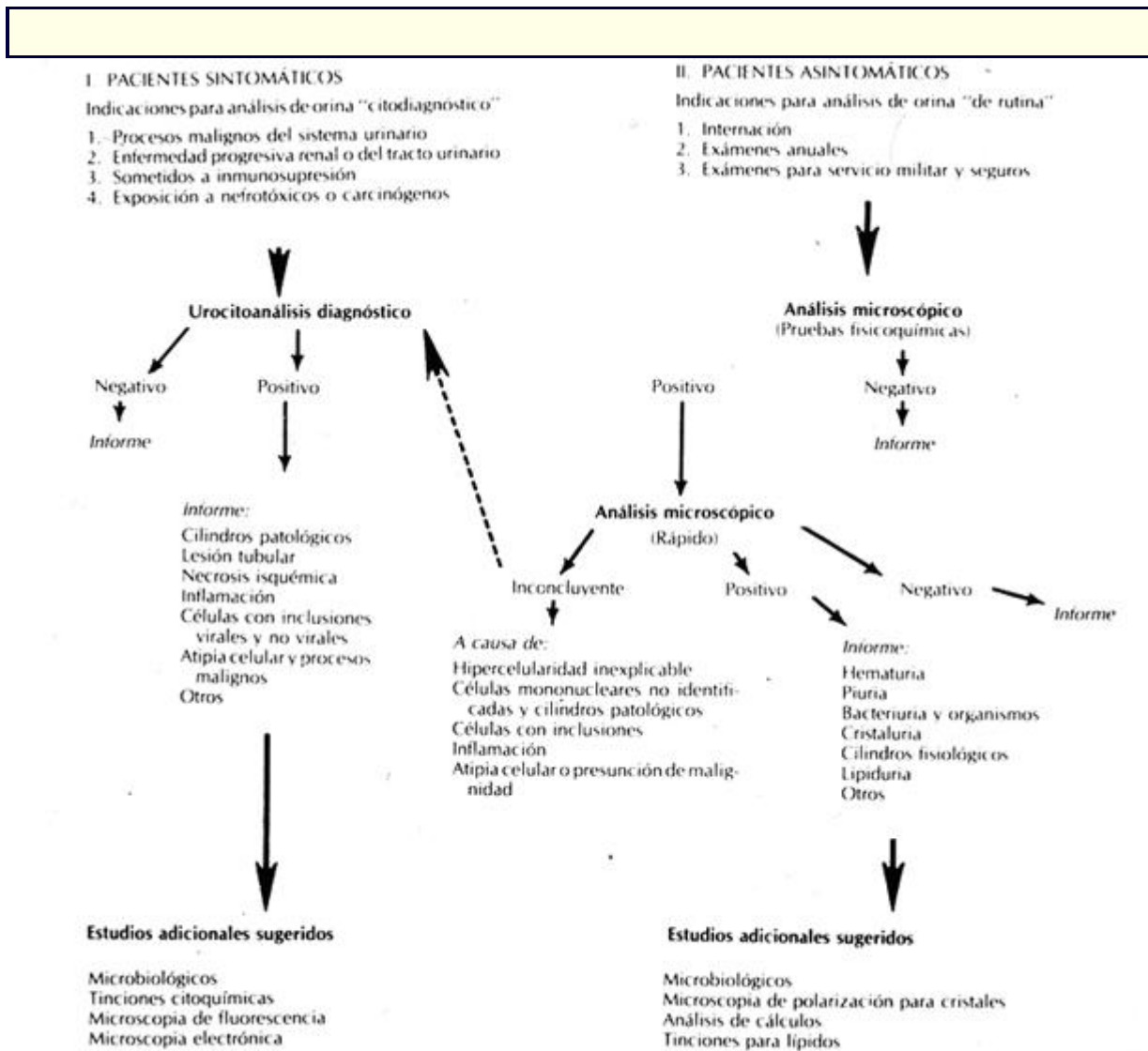


Figura 57-22 Estrategia coordinada para el análisis del sedimento urinario. (De Schumann GB, Schumann JL, Schweitzer SC: *Lab Management* 1:47, 1983.)



FEDERACIÓN INTERNACIONAL DE QUÍMICA CLÍNICA
DIVISIÓN CIENTÍFICA
GRUPO DE TRABAJO SOBRE TERMINOLOGÍA Y NOMENCLATURA
EN QUÍMICA CLÍNICA EN LENGUA ESPAÑOLA

DICCIONARIO INGLÉS-ESPAÑOL DE CIENCIAS DEL LABORATORIO CLÍNICO

Preparado para publicación por
X. FUENTES ARDERIU 1,2
M.J. CASTIÑEIRAS ACAMBRA 1,2

Con la colaboración de
F.A. NAVARRO GONZÁEZ 3

¹Comisión de Terminología

Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular

²Servei de Bioquímica Clínica

Ciutat Sanitària i Universitària de Bellvitge

Hospitalet de llobregat, Barcelona, España

³Servicio de Traducción

F.Hoffmann-a Roche SA

Basilea, Suiza

Miembros del Grupo de Trabajo durante el periodo en que se ha preparado este diccionario:

Coordinador: X. Fuentes Arderiu (España).



Miembros titulares: R. Álvarez Echevarría (Cuba), .F. Bertello (Argentina), M.J. Castiñeiras acambra

(España), D. Mazziotta (Argentina), A. Salinas Toledo (Chile).

Miembros asociados: R. Alfaro (Panamá), N. Betances de Holguín (Rep. Dominicana), N. Bladés (Bolivia),

A.. Cáceres de Masselli (Guatemala), J.M. Castagnino (Argentina), A. Díaz de Chávez (El Salvador), F.

Gómez Argaña (Paraguay), M.A. Mora de Sarria (Nicaragua), M. Pérez Vega (Ecuador), S. Raymondo de

Fernández (Uruguay), M. Rosario Gómez (Rep. Dominicana), A. Rothstein (Colombia), E. Valencia Font

(México), E. Boquet Jiménez [Microbiología] (España), G. Ruiz Reyes [Hematología] (México).

Geraciones generales

Las entradas que van acompañadas del símbolo son abreviaturas o términos no recomendados internacionalmente y van seguidas de la traducción al español del término internacionalmente. Recomendado correspondiente (1-45).

Los números en negrita y cursiva que preceden a algunos términos en español indican las diversas acepciones en español, cuyo uso depende del contexto. El punto y coma entre los términos españoles indica que se pueden utilizar indistintamente; no obstante, el orden en que están escritos indica la preferencia de uso. En algunos casos aparece, entre corchetes y en letra cursiva, alguna explicación que facilita la comprensión del término en español.

Los nombre españoles de las enzimas de este diccionario se caracterizan por el uso generalizado de un guión en la posición que en inglés ocupa un espacio en blanco. Estos términos constituyen una mejora terminológica respecto a los previamente recomendados por la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular (46).

Alguna de las grafías utilizadas, como "i" en lugar de "y" en algunos casos, pueden resultar extrañas en alguno de los países de habla hispana; su uso se ha decidido por consenso, como todos los criterios adoptados para la realización de este diccionario.

Diccionario inglés-español



Abbe condenser - condensador de Abbe

abdominal tap: paracentesis

Abel's bacillus - Klebsiella ozaenae

abscess - absceso

absolute chemical activity - actividad química absoluta

absolute chemical potential - potencial químico absoluto

absolute error - error absoluto

absolute lethal concentration - concentración letal absoluta

absolute temperature - temperatura absoluta

absorbance - absorbancia

absorbed concentration - concentración absorbida

absorbed dose - dosis absorbida

absorptance - absortancia

absorption - absorción

absorption coefficient - coeficiente de absorción

absorption factor - factor de absorción

absorption spectrum - espectro de absorción

absortance factor - factor de absortancia

abstract - resumen

acceleration - aceleración

acceptor site - centro aceptor



accreditation - acreditación

accuracy - exactitud

ACE - peptidil-dipeptidasa A

acetaminophen: paracetamol

acetate kinase - acetato-cinasa

acetate thiokinase - acetil CoA-ligasa

acetoacetate - [ácido acetoacético más ion acetoacetato] acetoacetato

acetoacetic acid - [cuando en realidad hace referencia a ácido ACETOACÉTICO más ion ACETOACETATO]

acetoacetic acid - ácido acetoacético

acetoacetyl-CoA thiolase - acetil-CoA-C-acetiltransferasa

acetokinase - acetato-cinasa

acetone - acetona

acetyl activating enzyme - acetil CoA-ligasa

acetylcholinesterase - acetilcolinesterasa

acetyl-CoA C-acetyltransferase - acetil-CoA-C-acetiltransferasa

acetyl-CoA C-acyltransferase - acetil-CoA-C-aciltransferasa

acetyl-CoA carboxylase - acetil-CoA-carboxilasa

acetyl CoA ligase - acetil CoA-ligasa

acetyl CoA synthetase - acetil CoA-ligasa

acetyl-coenzyme A - acetil-coenzima A

N-acetylgalactosamine-4-sulfatase - N-acetilgalactosamina-4-sulfatasa

N-acetylgalactosamine-6-sulfatase - N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa



N-acetylglucosamine-6-sulfatase - N-acetilglucosamina-6-sulfatasa

N-acetyl-b-glucosaminidase - N-acetil-b-glucosaminidasa

a-N-acetylglucosaminidase - a-N-acetilglucosaminidasa

b-N-acetylglucosaminidase - b-N-acetilglucosaminidasa

b-N-acetyl-D-glucosaminide b-1,4-galactosyltransferase - b-N-acetilglucosaminilglicopéptido-b-1,4-

galactosiltransferasa

N4-(b-N-acetylglucosaminy)-asparaginase - N4-(b-N-acetilglucosaminil)-asparraginasas

b-N-acetylglucosaminyglycopeptide - b-N-acetilglucosaminilglicopéptido-b-1,4-galactosiltransferasa

N-acetylglucosaminyolphosphotransferase - UDP-N-acetilglucosamina enzima lisosómica

N-acetylglutamate synthetase - aminoácido-N-acetiltransferasa

N-acetylglutamate transferase - aminoácido-N-acetiltransferasa

b-N-acetylhexosaminidase - b-N-acetilhexosaminidasa

N-acetylactosamine synthase - 1. b-N-acetilglucosaminilglicopéptido-b-1,4-galactosiltransferasa 2.

lactosa -sintasa

N-acetylactosaminide a-2,3-sialyltransferase - N-acetilactosaminida-a-2,3-sialiltransferasa

N-acetylneuraminate lyase - N-acetilneuraminato-liasa

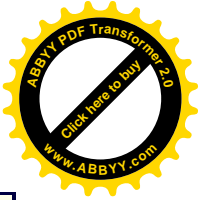
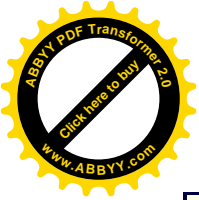
N-acetyl-neuraminic acid aldolase - N-acetilneuraminato-liasa

achromatic condenser - condensador acromático

achromatic spindle - huso acromático

Achromobacter iophagus collagenase - colagenasa microbiana

Achromobacter proteinase I - lisil-endopeptidasa



acid-base balance - equilibrio acidobásico

acid ceramidase - ceramidasa

acid-fast - ácidorresistente

acid-fast stain - tinción de ácidorresistencia; tinción de Ziehl-Neelsen

a1-acid glycoprotein - a1-glicoproteína ácida

acid maltase - glucano-1,4-a-glucosidasa

acidotic - acidótico

acid phosphatase - fosfatasa ácida

acid phosphomonoesterase - fosfatasa ácida

ACIF test - prueba inmunofluorescente de anticomplemento

ACP - fosfatasa ácida

acrosin - acrosina

ACTH - 1. [sustancia endógena] corticotropina. 2. [fármaco] corticotrofina

actinomycin D - dactinomicina

activated Christmas factor - factor IXa de la coagulación

activated protein C - proteína C activada

activator - activador

active site - centro activo

activity - actividad

activity coefficient - coeficiente de actividad

activity (radionuclide) - actividad (radionucleido)

actual - real

acute-phase protein - proteína de fase aguda



acyl-activating enzyme - 1. acetil CoA-ligasa 2. ácido graso de cadena larga CoA-ligasa

acyl-CoA dehydrogenase - acil CoA-deshidrogenasa

acyl-CoA synthetase - ácido graso de cadena larga CoA ligasa

acyl-CoA oxidase - acil-CoA-oxidasa

acyl dehydrogenase - acil-CoA-deshidrogenasa

acylsphingosine deacylase - ceramidasa

ADA - adenosina-desaminasa

adaptor tRNA - tRNA adaptador

addition mutation - mutación por adición

adenine - adenina

adenine phosphoribosyltransferase - adenina-fosforribosiltransferasa

adenosine - adenosina

adenosine deaminase - adenosina-desaminasa

adenosine 5'-diphosphate - 5'-difosfato de adenosina

adenosine 3'-5'-phosphate - 3'-5'-fosfato de adenosina

adenosine 5'-phosphate - 5'-fosfato de adenosina

adenosine 5'-triphosphate - 5'-trifosfato de adenosina

adenosinetriphosphatase - adenosinatrifosfatasa

adenovirus - adenovirus

adenylate cyclase - adenilato-ciclasa

adenylate deaminase - AMP-desaminasa

adenylate kinase - adenilato-cinasa



adenyl cyclase - adenilato-ciclasa

adenylic acid deaminase - AMP-desaminasa

adenylosuccinase - adenilosuccinato-liasa

adenylosuccinate lyase - adenilosuccinato-liasa

adenylosuccinate synthase - adenilosuccinato-sintasa

adenylpyrophosphatase - adenosinatrifosfatasa

adenylcyclase - adenilato-ciclasa

ADH - alcohol-deshidrogenasa

ADH - vasopresina

adherence assay - ensayo de adherencia

adiuretin - vasopresina

adjuvant - adyuvante

adrenal - suprarrenal

adrenal cortex - corteza suprarrenal

adrenal gland - glándula suprarrenal

adrenaline - adrenalina

adrenaline - [cuando en realidad hace referencia a adrenalina más ion adrenalinio] adrenalinio

adrenalinium - [adrenalina más ion adrenalinio] adrenalinio

adrenalin oxidase - amina-oxidasa (flavinífera)

adrenocorticotropic hormone - corticotropina

adsorption - adsorción

adsorption chromatography - cromatografía de adsorción

aerogenic - aerogénico



Aeromonas proteolytica neutral proteinase - aeromonolisina

aeromonolysin - aeromonolisina

aerosol - aerosol

aerotolerant - aerotolerante

aetiology - etiología

affinity chromatography - cromatografía de afinidad

affinity constant - constante de afinidad

agar - agar

agar diffusion test - prueba de difusión en agar

agarose - agarosa

agglutination - aglutinación

agglutinin - aglutinina

Agkistrodon serine proteinase - venombina A

AIDS - sida

airborne transmission - transmisión aérea

AA dehydratase - porfobilinógeno-sintasa

alanine - alanina

alanine aminopeptidase - alanila-aminopeptidasa de membrana

alanine aminotransferase - alanina-aminotransferasa

alanine dehydrogenase - alanina-deshidrogenasa

alanine glyoxylate transaminase - alanina glioxilato-transaminasa

b-alanine oxoglutarate transaminase - 4-aminobutirato-transaminasa



alanine transaminase - alanina-aminotransferasa

AAT - alanina-aminotransferasa

albumin - albúmina

albuminaemia - **1.** concentración de albúmina en plasma **2.** concentración de albúmina en suero

albuminuria - [con el significado de] **1.** concentración de albúmina en orina **2.** excreción de albúmina en *orina*

alcohol dehydrogenase (NADP+) - alcohol-deshidrogenasa (NADP+)
alcohol dehydrogenase [NAD(P)+]: alcohol-deshidrogenasa [NAD(P)+]

alcohol dehydrogenase - alcohol-deshidrogenasa

alcohol oxidase - alcohol-oxidasa

aldehyde dehydrogenase [NAD(P)+] - aldehído-deshidrogenasa [NAD(P)+]

aldehyde monooxygenase - alcanal-monooxygenasa (unida a FMN)

aldehyde oxidase - aldehído-oxidasa

aldehyde reductase - alcohol-deshidrogenasa

aldehyde reductase (NADPH) - alcohol-deshidrogenasa (NADP+)

aldimine - aldimina

aldoketomutase - lactoilglutación-liasa

aldolase - fructosa-bisfosfato-aldolasa

aldolase 1 - fructosa-bisfosfato-aldolasa

aldolase A - fructosa-bisfosfato-aldolasa

aldolase B - fructosa-bisfosfato-aldolasa

aldose 1-epimerase - aldosa-1-epimerasa

aldose mutarotase - aldosa-1-epimerasa



aldosterone - aldosterona

algorithm - algoritmo

ali-esterase - carboxilesterasa

aliquot - alícuota

alkaline phosphatase - fosfatasa alcalina

alkaline phosphomonoesterase - fosfatasa alcalina

alkanal monooxygenase (FMN-linked) - alcanal-monooxigenasa (unida a FMN)

allele - alelo

allele displacement - sustitución alélica

allele replacement - sustitución alélica

allele-specific oligonucleotide probe - sonda oligonucleotídica específica de un alelo

allelotype - alelotipo

allergen - alérgeno

allergy - alergia

allosteric enzyme - enzima alostérica

allowable maximum imprecision - imprecisión máxima tolerable

allowable maximum inaccuracy - inexactitud máxima tolerable

AP - fosfatasa alcalina

alpha-fetoprotein - a-fetoproteína

AT - alanina-aminotransferasa

alternative pathway - vía alternativa

alveolus - alvéolo

amber codon - codón ámbar



amber mutation - mutación ámbar

amebae - ameba

amidophosphoribosyltransferase - amidofosforribosiltransferasa

amikacin - amikacina

amine oxidase - amina-oxidasa (flavinífera)

amine oxidase (copper-containing) - amina-oxidasa (cuprífera)

amine oxidase (flavin-containing) - amina-oxidasa (flavinífera)

amine oxidase (pyridoxal-containing) - amina-oxidasa (cuprífera)

amino acid - aminoácido

amino-acid N-acetyltransferase - aminoácido-N-acetiltransferasa

amino-acid arylamidase - alanil-aminopeptidasa de membrana

D-amino acid oxidase - D-aminoácido-oxidasa

-amino acid oxidase - -aminoácido-oxidasa

aminoacylhistidine dipeptidase - X-His-dipeptidasa

4-aminobutyrate transaminase - 4-aminobutirato-transaminasa

aminoglycoside - aminoglicósido

5-aminolevulinate - [ácido 5-aminolevulínico más ion 5-aminolevulinato] 5-aminolevulinato

d-aminolevulinate dehydrase - porfobilinógeno-sintasa

5-aminolevulinate dehydratase - porfobilinógeno-sintasa

d-aminolevulinate dehydratase - porfobilinógeno-sintasa

5-aminolevulinate synthase - 5-aminolevulinato-sintasa

5-aminolevulinic acid - ácido 5-aminolevulínico



5-aminolevulinic acid - [cuando en realidad hace referencia a ácido 5-aminolevulínico más ion 5-AMINOEVUINATO] 5-aminolevulinato

d-aminolevulinic acid - [cuando en realidad se hace referencia a ácido 5-aminolevulínico más ion aminolevulinato] 5-aminolevulinato

d-aminolevulinic acid dehydrase - porfobilinógeno-sintasa

d-aminolevulinic acid dehydratase - porfobilinógeno-sintasa

aminomethyltransferase - aminometiltransferasa

amino-oligopeptidase - alanil-aminopeptidasa de membrana

aminopeptidase M - alanil-aminopeptidasa de membrana

aminopeptidase N - alanil-aminopeptidasa de membrana

ammonia - amoníaco

ammonia - [cuando en realidad hace referencia a amoníaco más ion amonio] amonio

ammoniemia - **1.** concentración de amonio en plasma **2.** concentración de amonio en suero

ammonium - [amoníaco más ion amonio] amonio

amniotic fluid - líquido amniótico

amniotic fluid cells (cultured) - células (cultivadas) de líquido amniótico

amount - cantidad

amount of substance - cantidad de sustancia

(amount of) substance concentration - concentración de (cantidad de) sustancia

(amount of) substance content - contenido de (cantidad de) sustancia

(amount of) substance flow rate - caudal de (cantidad de) sustancia

(amount of) substance fraction - fracción de (cantidad de) sustancia

(amount of) substance rate - caudal de (cantidad de) sustancia

amoxicillin - amoxicilina



AMP aminase - AMP-desaminasa

AMP deaminase - AMP-desaminasa

ampere - ampere

amperometry - amperimetría

ampicillin - ampicilina

amplification - [en biología molecular] amplificación

amplimer - amplímero

AMP pyrophosphorylase - adenina-fosforribosiltransferasa

amygdalase - b-glucosidasa

amygdaline exudate - exudado amigdalino

a-amylase - a-amilasa

b-amylase - b-amilasa

g-amylase - glucano-1,4-a-glucosidasa

amylasemia - **1.** concentración de a-amilasa en plasma **2.** concentración de a-amilasa en suero

amylasuria - **1.** concentración de a-amilasa en orina **2.** excreción de a-amilasa en orina

amyloglucosidase n - glucano-1,4-a-glucosidasa

amylo-1,6-glucosidase - amilo-1,6-glucosidasa

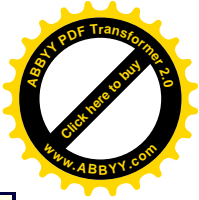
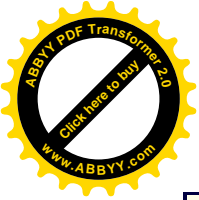
amylopectin - a-dextrina-endo-1,6-a-glucosidasa

amylophosphorylase - glucógeno-fosforilasa

amylo-(1,4 _ 1,6)-transglucosidase - 1,4-a-glucano-6-a-glucosiltransferasa

amylo-(1,4 _ 1,6)-transglycosylase - enzima ramificadora del 1,4-a-glucano

ANA - anticuerpos antinucleares



anabolism - anabolismo

anaerobe - anaerobio

anaerobic bacilli - bacilo anaerobio

anaerobic chamber - cámara anaerobia

anaerobic culture - cultivo para anaerobios

anaerobic gram-negative coccus - coco anaerobio gramnegativo

anaerobic gram-negative rod - bacilo anaerobio gramnegativo

anaerobic gram-positive coccus - coco anaerobio grampositivo

anaerobic gram positive rod - bacilo anaerobio grampositivo

anaerobic incubation system - sistema anaeróbico de incubación

anaerogenic - anaerogénico

anal mucus - muco anal

analyser - analizador

analysis - análisis

analytical chemistry - química analítica

analytical curve - curva analítica

analytical function - función analítica

analytical instrument - instrumento analítico

analytical intercomparison - intercomparación analítica

analytical interference - interferencia analítica

analytical interferent - interferente analítico

analytical method - método analítico

analytical performance characteristic - característica analítica



analytical portion - porción analítica

analytical procedure - procedimiento analítico

analytical process - proceso analítico

analytical radiochemistry - radioquímica analítica

analytical range - intervalo analítico

analytical run - serie analítica

analytical specificity - especificidad analítica

analytical system - sistema analítico

analyser - analizador

androstenedione - androstenodiona

aneuploidy - aneuploidía

angiotensin - angiotensina

angiotensin I - proangiotensina

angiotensin II - angiotensina

angiotensin I-converting enzyme - peptidil-dipeptidasa A

angiotensin-forming enzyme: renina

angiotensinogenase - renina

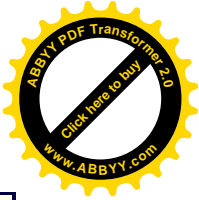
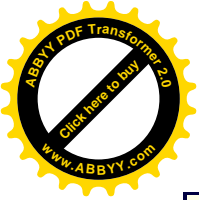
anhydrase carbonic - carbonato-deshidratasa

annealing - fijado

anti-antibody - antianticuerpo

antibiogram - antibiograma

antibiotic - antibiótico



antibody - anticuerpo

antibody anti cardiolipin - anticuerpo contra la cardiolipina

antibody anti-core - anticuerpo contra el núcleo

antibody anti-Jo-1 antigen - anticuerpo contra el antígeno Jo-1

antibody anti-Ku antigen - anticuerpo contra el antígeno Ku

antibody anti-a/SS-B antigen - anticuerpo contra el antígeno a/SS-B

antibody anti-Ro/SS-A antigen - anticuerpo contra el antígeno RoSS-A

antibody anti-Scl-70 antigen - anticuerpo contra el antígeno Scl-70

antibody anti-Sm antigen - anticuerpo contra el antígeno Sm

anticoagulant - anticoagulante

anticoding strand - cadena intrascrita

anticodon - anticodón

antidiuretic hormone - vasopresina

antifungal - antifúngico

antigen - antígeno

antigenic determinant - epítoto

antihemophilic globulin - factor VIII de la coagulación

antimessenger RNA - RNA antisentido

antimicrobial - antimicrobiano

antimicrobial diffusion agar method - método de la difusión en agar del antimicrobiano

antimicrobial diffusion disk test - prueba de la difusión en disco del antimicrobiano

antimicrobial dilution agar method - método de la dilución en agar del antimicrobiano

antimicrobial susceptibility test - prueba de la sensibilidad antimicrobiana



antimicrosomal antibody - anticuerpo antimicrosómico

antimitochondrial antibody - anticuerpo antimitocondrial

antimycobacterial - antimicobacteriano

antinuclear antibody - anticuerpo antinuclear

a2-antiplasmin - a2-antiplasmina

antisense RNA - RNA antisentido

antisense strand - cadena antisentido

antiseptic - antiséptico

antiserum - antisuero

antiserum avidity - avidez de un antisuero

antistreptolysin O - antiestreptolisina O

antitermination - antiterminación

antithrombin III - antitrombina III

antitoxin - antitoxina

a1-antitrypsin - a1-antitripsina

antiviral - antivírico

apolipoprotein (a) - apolipoproteína (a)

apolipoprotein A-I - apolipoproteína A-I

apolipoprotein B - apolipoproteína B

apolipoprotein B-48 - apolipoproteína B-48

apolipoprotein B-100 - apolipoproteína B-100

apolipoprotein E - apolipoproteína E



apoptosis - apoptosis

arabinose - arabinosa

arbitrary kind of quantity - tipo de magnitud arbitrario

arbitrary standard - patrón arbitrario

arbovirus - arbovirus

areic - aréico

arginase - arginasa

arginine - arginina

arginine amidinase - arginasa

argininosuccinase - **1.** argininosuccinato-liasa **2.** argininosuccinato-sintasa

argininosuccinate lyase - argininosuccinato-liasa

argininosuccinate synthase - argininosuccinato-sintasa

argininosuccinate synthetase - argininosuccinato-sintasa

arginosuccinase - argininosuccinato-liasa

arginosuccinate synthetase - argininosuccinato-sintasa

argipressin - argipresina

arthropod - artrópodo

arylsulfatase - arilsulfatasa

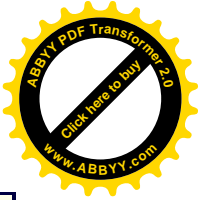
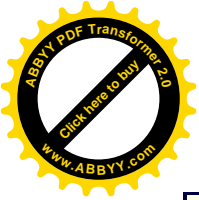
arylsulfatase A - **1.** arilsulfatasa **2.** cerebrósido-sulfatasa

arylsulfatase B - N-acetilgalactosamina-4-sulfatasa

arylsulfatase C - esteril-sulfatasa

aryl sulfotransferase - aril-sulfotransferasa

ASA synthase - argininosuccinato-sintasa



ASAT - aspartato-aminotransferasa

ascitic fluid - líquido ascítico

ascorbase - -ascorbato-oxidasa

ascorbate - [ácido ascórbico más ion ascorbato] ascorbato

-ascorbate oxidase - -ascorbato-oxidasa

ascorbic acid - ácido ascórbico

ascorbic acid - [cuando en realidad hace referencia a ácido ascórbico más ion ASCORBATO]
ascorbato

asparaginase - asparraginasas

asparaginase II - asparraginasas

asparagine - asparragina

aspartate - aspartato

aspartate aminotransferase - aspartato-aminotransferasa

aspartate transaminase - aspartato-aminotransferasa

aspartic acid - ácido aspártico

aspartylglucosaminidase - N4-(b-N-acetilglucosaminil)--asparraginasas

aspartylglucosylaminase - N4-(b-N-acetilglucosaminil)--asparraginasas

aspartylglucosylamine deaspartylase
N4-(b-N-acetilglucosaminil)--asparraginasas

aspergillopepsin A - aspergillopepsina I

aspergillopepsin F - aspergillopepsina I

aspergillopepsin I - aspergillopepsina I

aspergillopeptidase A - aspergillopepsina I



Aspergillus nuclease S1 - nucleasa S1 de *Aspergillus*

Aspergillus oryzae aspartic proteinase - aspergiloepsina I

assay - 1. ensayo. 2. valoración.

assay - 1. procedimiento. 2. método

assigned value - valor asignado

assimilation test - prueba de asimilación

assistant - 1. ayudante. 2. adjunto. 3. auxiliar

ASAT - aspartato-aminotransferasa

at rest - en reposo

atomic absorption - espectrometría de absorción atómica

atomic mass - masa atómica

atomic mass constant - constante de masa atómica

atomic mass unit - unidad de masa atómica

atomic number - número atómico

atomic weight - peso atómico

ATPase - adenosinatrifosfatasa

ATP monophosphatase - adenosinatrifosfatasa

attenuance - atenuancia

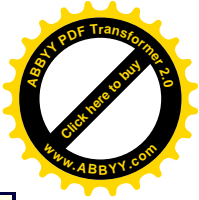
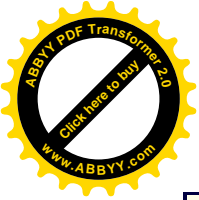
attenuation coefficient (linear) - coeficiente (lineal) de atenuación

auramine-rhodamine stain - tinción con auramina y rodamina

autoantibody - autoanticuerpo

autoclave - autoclave

automation - automatización



autonomus replicating sequence - secuencia de replicación autónoma

autoradiograph - autorradiografía

autotroph - autótrofo

auxotroph - auxótrofo

Avogadro constant - constante de Avogadro

Avogadro number - número de Avogadro

awamotin - aspergillopepsina I

axerol - retinol

axerophtal - retinal

axerophtol - retinol

azlocillin - azlocilina

azotemia - 1. concentración de urea en plasma 2. concentración de urea en suero

aztreonam - aztreonam

B

B. atrox coagulant enzyme - venombina A

B-cell - linfocito B

B lymphocyte - linfocito B

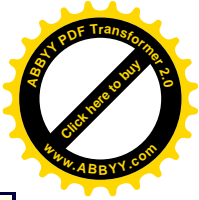
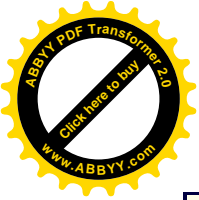
bacampicillin - bacampicilina

Bacillus thermoproteolyticus neutral proteinase - termolisina

back mutation - mutación restauradora

bacteremia - bacteriemia

bacteria - bacterias



bacterial luciferase - alcanal-monooxigenasa (unida a FMN)

bactericidal - bactericida

bactericidal activity test - prueba de la actividad bactericida

bacterial cast - cilindro bacteriano

bacteriocin typing - tipificación con bacteriocinas

bacteriology - bacteriología

bacteriophage - bacteriófago

bacteriostatic - bacteriostático

bacterium - bacteria

bacteriuria -bacteriuria

band - banda

band granulocyte - neutrofilocito no segmentado; neutrófilo no segmentado

band neutrophil - neutrofilocito no segmentado; neutrófilo no segmentado

band neutrophilocyte - neutrofilocito no segmentado; neutrófilo no segmentado

band shift - desplazamiento de banda

banding pattern - diagrama de bandas

Bang's bacillus - Brucella abortus

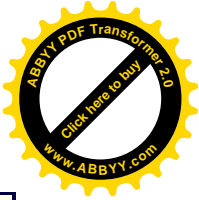
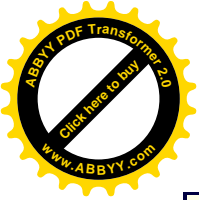
barbiturate - [ácido barbitúrico más ion barbiturato] barbiturato

barbituric acid - ácido barbitúrico

barbituric acid - [cuando en realidad hace referencia a ácido barbitúrico más ion BARBITURATO] barbiturato

Barton's bacillus - Bartonella bacilliformis

base - base



base pairing - apareamiento de bases

base quantity - magnitud de base

base unit (of measurement) - unidad de base (de medida)

baseline - **1.** línea de base **2.** situación basal

basophil - basofilocito; basófilo

basophilocyte - basofilocito; basófilo

batch culture - cultivo discontinuo

batch operation - operación por grupos

batroxobin - batroxobina

Battey's bacillus - Mycobacterium intracellulare

Bayes' theorem - teorema de Bayes

BCG - Mycobacterium bovis (avirulento)

becquerel - becquerel

bed side test - determinación junto a la cabecera del paciente

Beer-ambert-Bouguer law - ley de Beer-ambert-Bouguer

Bence Jones protein - proteína de Bence Jones

bentiromide - bentiromida

benzidine test - determinación de sangre en heces

benzoylcholinesterase - colinesterasa

between-day imprecision - imprecisión interdiaria

between-run imprecision - imprecisión interserial

between-subject biological variability - variabilidad biológica interindividual



between-subject biological variation - variación biológica interindividual

bias - error sistemático

bicarbonate - [sustancia endógena] hidrogenocarbonato

BICARBONATE - [fármaco] bicarbonato

bile - bilis

bile acid - ácido biliar

bilirubin - bilirrubina

bilirubin ester - bilirrubina esterificada

bilirubin non-esterified - bilirrubina no esterificada

binding capacity - capacidad enlazante

binding site - centro de unión

bioassay - bioensayo; bioanálisis

bioavailability - biodisponibilidad

biochemical profile - perfil bioquímico

biochemical quantity - magnitud bioquímica

biochemistry - bioquímica

bioelectronics - bioelectrónica

biological chemistry - bioquímica

biological fluid - líquido biológico

biological half-life - semivida biológica

biological plausibility - verosimilitud biológica

biological quantity - magnitud biológica

biological reference interval - intervalo de referencia biológico



biological variability - variabilidad biológica

biological variation - variación biológica

biometry - biometría

biopsy - biopsia

biosafety - bioseguridad

biosensor - biosensor

biotechnology - biotecnología

biotin - biotina

biotinidase - biotinidasa

biotin [propionyl-CoA-carboxylase (ATP-hydrolysing)] ligase - biotina
[propionil-CoA-carboxilasa (hidrolizante de ATP)]-ligasa

biotin-[propionyl-CoA-carboxylase (ATP-hydrolysing)] synthetase - biotina
[propionil-CoA-carboxilasa (hidrolizante de ATP)]-ligasa

biotinylation -biotinilación

biotype - biotipo

biotyping - biotipificación

bisphosphoglycerate mutase - bisfosfoglicerato-mutasa

bisphosphoglycerate phosphatase - bisfosfoglicerato-fosfatasa

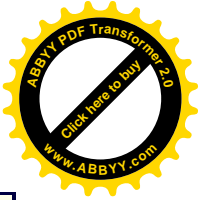
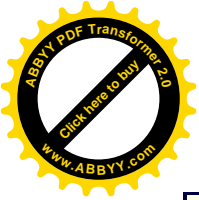
bisphosphoglycerate synthase - bisfosfoglicerato-mutasa

bisphosphoglyceromutase - bisfosfoglicerato-mutasa

biuret - biuret

blank - blanco

blank value - valor del blanco



blastoconidium - blastoconidio

bleeding time - tiempo de sangría

blood - sangre

blood agar - agar-sangre

blood count - hemograma

blood culture - hemocultivo

blood film - extensión sanguínea

blood type - grupo sanguíneo

blood urea nitrogen - 1. concentración de urea en plasma 2. concentración de urea en suero

blot - transferencia (por adsorción)

blotting - transferencia por adsorción

blunt end - extremo romo

body fluid - líquido biológico

body weight - masa corporal

bone marrow - médula ósea

Bordet-Gengou's bacillus - Bordetella pertussis

Bothrops atrox serine proteinase - venombina A

box -secuencia

bradikinin - bradicinina

brain heart infusion agar - agar-infusión de cerebro y corazón

branched-chain α -keto acid dehydrogenase - 3-metil-2-oxobutanoato- deshidrogenasa (lipoamida)

branching enzyme - enzima ramificadora del 1,4-a-glucano



branch migration - prolongación del apareamiento

break and reunion model - modelo de rotura y reunión

breast - mama

brightfield microscopy - microscopía de campo claro

bromelain - bromelaína de tronco

bromocriptine - bromocriptina

bronchial brushing - raspado bronquial

bronchial lavage - lavado bronquial

broth - caldo

buffer - tampón

buffer capacity - capacidad tamponadora

buffy-coat - capa leucocitaria

BUN - [con el significado de] 1. concentración de urea en plasma 2. concentración de urea en suero

bupropion - anfebutamona

butyrylcholine esterase - colinesterasa

C

cachet - sello

calcemia - 1. concentración de calcio en plasma 2. concentración de calcio en suero

calcidiol - calcidiol

calcifediol - calcidiol

calciferol - ercalciol

calciol - calciol



calcitonin - calcitonina

calcitriol - calcitriol

calcium - calcio

calcium ion - ion calcio

calciuria - **1.** concentración de calcio en orina **2.** excreción de calcio en orina

calibrated flask - matraz aforado

calibrated loop: asa calibrada

CALIBRATED PIPET - pipeta aforada

calibration - calibración

calibration curve - curva de calibración

calibration function - función de calibración

calibration material - material de calibración

calibration standard - patrón de calibración

calibrator - calibrador

Calmette-Guerin's bacillus - Mycobacterium bovis (avirulento)

canavanase - arginasa

candela - candela

cap - remate

capacitance - capacitancia

capneic incubation - incubación capneica

capnophilic - capnofílico

capsid - cápsida



carbamazepine - carbamazepina

carbamoyl-phosphate synthase (ammonia) - carbamoíl-fosfato-sintasa (amoníaco)

carbamyl phosphate synthetase - carbamoíl-fosfato-sintasa (amoníaco)

carbenicillin - carbenicilina

carbohydrate - glúcido; carbohidrato

carbohydrate assimilation test - prueba de la asimilación de glúcidos

carbohydrated antigen 15-3 - antígeno carbohidratado 15-3

carbohydrated antigen 19-9 - antígeno carbohidratado 19-9

carbohydrated antigen 50 - antígeno carbohidratado 50

carbohydrated antigen 125 - antígeno carbohidratado 125

carbonate dehydratase - carbonato-deshidratasa

carbon dioxide - dióxido de carbono

carbon-dioxide ammonia ligase - carbamoíl-fosfato-sintasa (amoníaco)

carbon monoxide haemoglobin - hemoglobina-monóxido de carbono

carbonic anhydrase - carbonato-deshidratasa

carboxypeptidase A - peptidil-dipeptidasa A

a-carboxylase - piruvato-descarboxilasa

carboxylesterase - carboxilesterasa

carboxypeptidase A - carboxipeptidasa A

carboxypeptidase B - carboxipeptidasa B

carboxypeptidase C - carboxipeptidasa de tipo serina

carboxypeptidase P - carboxipeptidasa de tipo serina

carboxypeptidase Y - carboxipeptidasa de tipo serina



carboxypolypeptidase - carboxipeptidasa A

carcinoembryonic antigen - antígeno carcinoembrionario

carnitine O-acetyltransferase - carnitina-O-acetiltransferasa

carnitine O-palmitoyltransferase - carnitina-O-palmitoiltransferasa

carnosinase - X-His-dipeptidasa

carotene oxidase - lipoxigenasa

carotenoid - carotenoide

carrier - portador

carrier-culture - cultivo portador

carry-over - contaminación

cassette - casete

cassette mechanism - mecanismo de casete

cast - cilindro (urinario)

castor oil - aceite de ricino

catabolism - catabolismo

catabolite activator protein - proteína activadora del catabolismo

catalase - catalasa

catalase test - prueba de la catalasa

catalyst - catalizador

catalytic activity - actividad catalítica

catalytic activity concentration - concentración de actividad catalítica

catalytic activity content - contenido de actividad catalítica



catalytic activity flow rate - caudal de actividad catalítica

catalytic activity fraction - fracción de actividad catalítica

catalytic activity rate - caudal de actividad catalítica

catalytic centre - centro catalítico

catalytic concentration - concentración catalítica

catalytic content - contenido catalítico

catalytic flow rate - caudal catalítico

catalytic fraction - fracción catalítica

catalytic rate - caudal catalítico

catecholamine - catecolamina

cathepsin A - carboxipeptidasa de tipo serina

cathepsin C - dipeptidil-peptidasa I

cathepsin D - catepsina D

catheter - catéter

causation - 1. causalidad. 2. etiología

CBC - hemograma

cDNA clone - clon de cDNA

cDNA library - genoteca de cDNA

CEA - antígeno carcinoembrionario

cefaclor - cefaclor

cefadroxil - cefadroxilo

cefalexin - cefalexina

cefaloridine - cefaloridina



cefamandole - cefamandol

cefazolin - cefazolina

cefixime - cefixima

cefmenoxime - cefmenoxima

cefmetazole - cefmetazol

cefonicid - cefonicido

cefoperazone - cefoperazona

cefotaxime - cefotaxima

cefotetan - cefotetano

cefoxitin - cefoxitina

cefradine - cefradina

cefsulodin - cefsulodina

ceftazidime - ceftazidima

ceftizoxime - ceftizoxima

ceftriaxone - ceftriaxona

cefuroxime - cefuroxima

cell - célula

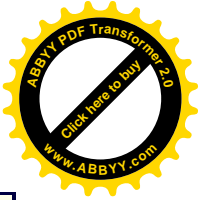
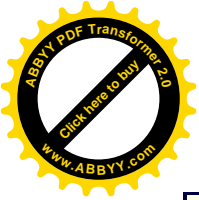
cell count - **1.** concentración de células. **2.** medida de la concentración de células. **3.** recuento de células

cell culture - cultivo celular

cell line - línea celular

cellobiase - b-glucosidasa

cellular plasminogen activator - activador del u-plasminógeno



cellulase - celulasa

Celsius degree - grado Celsius

Celsius temperature - temperatura Celsius

centrifugal force - fuerza centrífuga

centrifugal radius - radio centrífugo

centrifugation - centrifugación

centrifuge - centrifugadora; centrífuga

cephalexin - cefalexina

cephaloridine - cefaloridina

cephalosporinase - b-lactamasa

cephradine - cefradina

ceramidase - ceramidasa

ceramide trihexosidase - a-galactosidasa

ceramide trioxidase - a-galactosidasa

cerebroside-sulfatase - cerebrósido-sulfatasa

cerebroside sulfatase - arilsulfatasa

cerebrospinal fluid - líquido cefalorraquídeo

cerebrum - cerebro

certificate value - valor certificado

ceruloplasmin - ferroxidasa

cervical mucus - moco cervical

cervical pool - contenido cervical



cervix - cuello uterino

cestode - cestodo

CF test - prueba de fijación del complemento

CFU - partícula formadora de colonia; unidad formadora de colonia

CG - coriogonadotropina

chain reaction - reacción en cadena

chain terminator - finalizador de cadena

chair - 1. presidente. 2. coordinador

chairman - 1. presidente. 2. coordinador

chairperson - 1. presidente. 2. coordinador

channel - canal

Chantemesse-Widal's bacillus - *Shigella dysenteriae* de tipo 1

chaperone - chaperona

chaperonine - chaperonina

characteristic - característica

Charcot-eyden crystal - cristal de Charcot-eyden

charge - carga

charged tRNA - tRNA cargado

charge number - número de carga

Chauveau bacillus - *Clostridium chauvoei*

CHE - colinesterasa

check list - lista de comprobaciones

chelation - quelación



chemical analysis - análisis químico

chemically defined culture medium - medio de cultivo químicamente definido

chemically incomplete defined culture medium - medio de cultivo químicamente indefinido

chemical pathology - bioquímica clínica; química clínica

chemical potential - potencial químico

chemiluminiscence - quimioluminiscencia

chemotherapeutics - quimioterapia

chemometrics - quimiometría

chi - ji

chi square test - prueba de la ji al cuadrado; prueba de la c2

chitinase - quitinasa

chitodextrinase - quitinasa

chlamydospore - clamidospora

chloramphenicol - cloranfenicol

chloramphenicol O-acetyltransferase - cloranfenicol-O-acetiltransferasa

chlorhexidine - clorhexidina

chloride - cloruro

chlorine - cloro

chlorine - [con el significado de] cloruro

chlorpheniramine - clorfenamina

chlorpromazine - clorpromazina

cholecalciferol - calciol



cholecystokinin - pancroezimina

cholesteremia - **1.** concentración de colesterol en plasma **2.** concentración de colesterol en suero

cholesterin - colesterol

cholesterol - colesterol

cholesterol acyltransferase - esterol-O-aciltransferasa

cholesterol desmolase - colesterol-monoxigenasa (escisora de la cadena lateral)

cholesterol 20,22-desmolase - colesterol-monoxigenasa (escisora de la cadena lateral)

cholesterolemia - **1.** concentración de colesterol en plasma **2.** concentración de colesterol en suero

cholesterol esterase - esterol-esterasa

cholesterol 20,22-lyase - colesterol-monoxigenasa (escisora de la cadena lateral)

cholesterol monooxygenase (side-chain-cleaving) - colesterol-monoxigenasa (escisora de la cadena lateral)

cholesterol oxidase - colesterol-oxidasa

cholesteryl ester synthase - esterol-esterasa

cholic acid - ácido cólico

choline esterase I - acetilcolinesterasa

choline esterase II (unspecific) - colinesterasa

choline kinase - colina-cinasa

choline oxidase - colina-oxidasa

choline phosphatase - fosfolipasa D

cholinesterase - colinesterasa

cholinesterase - acetilcolinesterasa



chondroitin ABC eliminase - condroitina-ABC-liasa

chondroitin ABC lyase - condroitina-ABC-liasa

chondroitinase - **1.** N-acetilgalactosamina-4-sulfatasa **2.** N-acetilgalactosamina- 6-sulfatasa
3. condroitina-ABC-liasa

chondroitinase ABC - condroitina-ABC-liasa

chondroitinsulfatase - **1.** N-acetilgalactosamina-4-sulfatasa **2.** N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa **3.** N-acetilglucosamina-6-sulfatasa **4.** iduronato- 2-sulfatasa

chondrosulfatase - N-acetilgalactosamina-4-sulfatasa

choriogonadotropin: coriogonadotropina

choriomammotropin - coriomamotropina

chorionic gonadotrophin - [sustancia endógena] coriogonadotropina

chorionic gonadotrophin - [fármaco] gonadotropina coriónica

chorionic somatomammotropin - coriomamotropina

chorionic villi cell - células de las vellosidades coriónicas

chorionic villi cell (cultured) - células (cultivadas) de las vellosidades coriónicas

chromatogram - cromatograma

chromatograph - cromatógrafo

chromatography - cromatografía

chromophore - cromóforo

chromosome analysis - análisis cromosómico

chromosome banding - bandeo cromosómico

chromosome jumping - desplazamiento rápido sobre el cromosoma

chromosome paints - representaciones cromosómicas

chromosome set - dotación cromosómica



chromosome walking - desplazamiento sobre el cromosoma

chymotrypsin - quimotripsina

a-chymotrypsin - quimotripsina

chymotrypsin A4 - quimotripsina

chymotrypsin A and B - quimotripsina

cianocobalamin - cianocobalamina

ciclosporin - ciclosporina

CIE - contraimmunoelectroforesis

ciprofloxacin - ciprofloxacino

circulating antibody - anticuerpo circulante

cistron - cistrón

citrase - [citrato-(pro-3S)-liasa]

citratase - [citrato-(pro-3S)-liasa]

citrate - [ácido cítrico más ion citrato] citrato

citrate aldolase - [citrato-(pro-3S)-liasa]

citrate condensing enzyme - citrato-(si)-sintasa

[citrate (pro-3S)-lyase] - [citrato-(pro-3S)-liasa]

citrate (si)-synthase - citrato-(si)-sintasa

citric acid - ácido cítrico

citric acid - [cuando en realidad hace referencia a ácido cítrico más ion citrato] citrato

citridesmolase - [citrato-(pro-3S)-liasa]

citritase - [citrato-(pro-3S)-liasa]



citrogenase - citrato-(si)-sintasa

citrulline - citrulina

citrulline-aspartate ligase - argininosuccinato-sintasa

citrulline phosphorylase - ornitina-carbamoiltransferasa

CC - creatina-cinasa

CC-BB - creatina-cinasa 1

CC-MB - creatina-cinasa 2

CC-MM - creatina-cinasa 3

clarithromycin - claritromicina

classical pathway - vía clásica

clavulanic acid - ácido clavulánico

clearance - depuración

clearance of inuline - depuración de inulina

clearing factor lipase - lipoproteína-lipasa

cleavage - escisión

clindamycin - clindamicina

clinical analysis - análisis clínico

clinical assay - ensayo clínico

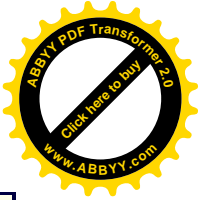
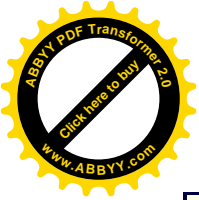
clinical biochemistry - bioquímica clínica; química clínica

clinical chemistry - bioquímica clínica; química clínica

clinical immunology - inmunología clínica

clinical laboratory sciences - ciencias de laboratorio clínico

clinical microbiology - microbiología clínica



clinical pathology - ciencias de laboratorio clínico

clinical performance characteristic - característica semiológica

clinical pharmacology - farmacología clínica

clinical toxicology - toxicología clínica

clone - clon

clonidine - clonidina

cloning - clonación

closed circle DNA - DNA circular cerrado

closed reading frame - marco de lectura cerrado

clostridiopeptidase A - colagenasa microbiana

Clostridium histolyticum collagenase - colagenasa microbiana

Clostridium oedematiens b- and g-toxins - fosfolipasa C

Clostridium welchii a-toxin - fosfolipasa C

clot - coágulo

clot-retraction time - tiempo de retracción del coágulo

cloxacillin - cloxacilina

cluster - [en estadística] agrupación

coagglutination test - prueba de la coaglutinación

coagulase test - prueba de la coagulasa

coagulation - coagulación

coagulation factor I - fibrinógeno

coagulation factor II - protrombina



coagulation Factor VIIa - factor VIIa de la coagulación

coagulation Factor VIII - factor VIII de la coagulación

coagulation Factor IXa - factor IXa de la coagulación

coagulation Factor Xa - factor Xa de la coagulación

coagulation Factor XIa - factor XIa de la coagulación

coagulation Factor XIIa - factor XIIa de la coagulación

cobalamin - cobalamina

cobaltinitrite - hexanitrocobaltato(III)

cocaine esterase - carboxilesterasa

coding strand - cadena transcrita

codon - codón

codon bias - preferencia codónica

coefficient - coeficiente

coefficient of variation - coeficiente de variación

coenzyme - coenzima

coenzyme A - coenzima A

cofactor - cofactor

cognate sequence - secuencia cognada

cognate tRNA - tRNA cognado

cohesive end - extremo cohesivo

cohort - cohorte

cold-sensitive mutant - mutante criolábil

colicin typing - tipificación con colicina; colicinotipia



colistin - colistina

colony - colonia

collagenase - collagenasa microbiana

collagenase A - collagenasa microbiana

collagenase 1 - collagenasa microbiana

colloidal - coloidal

colloid osmotic pressure - presión coloidosmótica

Colomiatti's bacillus - *Corynebacterium xerosis*

column - columna

column chromatography - cromatografía en columna

column packing - relleno de la columna

commensal - comensal

commensal microorganism - microorganismo comensal

communicable - 1. contagioso. 2. transmisible

comparatively - relativamente

competitive immunoassay - inmunoanálisis competitivo

competitive inhibition - inhibición competitiva

complement - complemento

complement component - componente del complemento

complement fixation - fijación del complemento

complementary deoxyribonucleic acid - ácido desoxirribonucleico complementario

complementary DNA - DNA complementario



complementary ribonucleic acid - ácido ribonucleico complementario

complete blood count - hemograma

complex - complejo

complex locus - locus complejo

compliance - cumplimiento; observancia

component - componente

composite transposon - transposón compuesto

computerized - informatizado; computadorizado

concatemer - concatémero

concentration - concentración

concentration gradient - gradiente de concentración

condenser - condensador

condensing enzyme - citrato-(si)-sintasa

conductance - conductancia

conductivity - conductividad

conductometry - conductimetría

conference - 1. congreso. 2. reunión. 3. simposio

confirmatory test - prueba confirmatoria

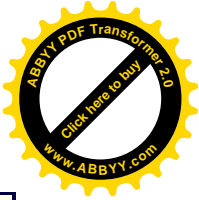
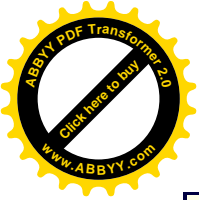
conical flask - matraz de Erlenmeyer; erlenmeyer

conidiophore - conidióforo

conjugated - [con el significado de] esterificado

conjugation - conjugación

consensus sequence - secuencia de consenso



consensus value - valor consensual

constant - constante

content - contenido

contents - [de un documento] índice

continuous flow - flujo continuo

continuous method - método continuo

continous operation - operación continua

contour clamped homogeneous electric field electrophoresis - electroforesis de campo eléctrico homogéneo de contornos limitados

contraception - anticoncepción

contraceptive - anticonceptivo

control group - [con el significado de] 1. grupo de referencia 2. grupo testigo

control material - material de control

convalescent serum - suero de convaleciente

convenor - coordinador

Coombs' test - prueba de Coombs

copper - cobre

coproporphyrin - coproporfirina

coproporphyrinogenase - coproporfinógeno-oxidasa

coproporphyrinogen oxidase - coproporfinógeno-oxidasa

copy DNA - DNA complementario

core - [de un virus] núcleo

corticoliberin - corticoliberina



corticosterone 18-hydroxylase - corticosterona-18-monoxigenasa

corticosterone methyl oxidase 1 - corticosterona-18-monoxigenasa

corticosterone 18-monooxygenase - corticosterona-18-monoxigenasa

corticotrophin - [sustancia endógena] corticotropina

corticotrophin - [fármaco] corticotrofina

corticotropin - coticotropina

corticotropin-releasing factor - corticoliberina

cortisol - cortisol

cortisone reductase - 3a(ó 20b)-hidroxiesteroide-deshidrogenasa

cos end - extremo cos

cos site - centro cos

cosmid - cósmido

cot value - cot

coulomb - coulomb

coulometry - culombimetría

count - **1.** cuenta **2.** recuento

counterimmunoelectrophoresis - contrainmunoelectroforesis

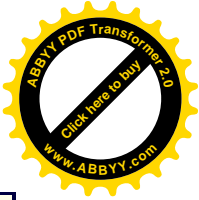
counterstain - contracoloración

countertranscript - contratranscrito

counting chamber - **1.** cámara de recuento. **2.** hemocitómetro; hematímetro

cover slip - cubreobjetos

C peptide - péptido C



CPK - creatina-cinasa

CPS - carbamoíl-fosfato-sintasa (amoníaco)

CPS I - carbamoíl-fosfato-sintasa (amoníaco)

C reactive protein - proteína C reactiva

creatinase - creatinasa

creatine - creatina

creatine kinase - creatina-cinasa

creatine phosphokinase - creatina-cinasa

creatininase - creatininasa

creatinine - creatinina

creatinine - [cuando en realidad se hace referencia a creatinina más ion creatininio]
creatininio

creatinine clearance - depuración de creatininio

creatinine deaminase - creatinina-desaminasa

creatininemia - **1.** concentración de creatininio en plasma **2.** concentración de creatininio en suero

creatininium - [creatinina más ion creatininio] creatininio

cresolase - monofenol-monoxigenasa

CRF - corticoliberina

cross-hibrydization - hibridación por cruzamiento

cross match - prueba de histocompatibilidad cruzada

crossed immunoelectrophoresis - inmunoelectroforesis cruzada

crossing-over - entrecruzamiento

crossover fixation - fijación entrecruzada



cross reaction - reacción cruzada

crotalase - venombina A

Crotalus adamanteus serine proteinase - venombina A

CRP - proteína C reactiva

cryoglobulin - crioglobulina

cryoprecipitable protein - proteína crioprecipitable

crystal violet stain - tinción con cloruro de metilrosanilina

CS - coriomamotropina

CSF protein content - concentración de proteína en líquido cefalorraquídeo

CSF sugar - concentración de glucosa en líquido cefalorraquídeo

culdocentesis - culdocentesis

culture - cultivo

culture medium - medio de cultivo

cut-off point - valor discriminante

cutting enzyme - enzima cortadora

cutting sequence - secuencia de corte

cybrid - cíbrido

3',5'-cyclic AMP synthetase - adenilato-ciclase

3'-5'-cyclic-nucleotide phosphodiesterase - nucleótido-3'-5'-cíclico-fosfodiesterasa

cyclooxygenase - prostaglandina-endoperoxido-sintasa

cyclosporin - ciclosporina

cyclosporin A - ciclosporina



cyclosporine - ciclosporina

cylindruria - cilindruria

cyst - quiste

cystathionase - cistationina-g-liasa

g-cystathionase - cistationina-g-liasa

cystathionine g-lyase - cistationina-g-liasa

cystathionine b-synthase - cistationina-b-sintasa

cysteine - cisteína

cysteine desulphydrase - cistationina-g-liasa

cystine - cistina

cystine desulphydrase - cistationina-g-liasa

cytidine deaminase - citidina-desaminasa

cytidine 5'-diphosphate - 5'-difosfato de citidina

cytidine 5'-phosphate - 5'-fosfato de citidina

cytidine 5'-triphosphate - 5'-trifosfato de citidina

cytidine - citidina

cytochemistry - citoquímica

cytochrome - citocromo

cytochrome a3 - citocromo-c-oxidasa

cytochrome aa3 - citocromo-c-oxidasa

cytochrome-b5 reductase - citocromo-b5-reductasa

cytochrome-c oxidase - citocromo-c-oxidasa

cytochrome oxidase - citocromo-c-oxidasa



cytochrome P-450_{scc} - colesterol-monoxigenasa (escisora de la cadena lateral)

cytogenetics - citogenética

cytology - citología

cytometry - citometría

cytopathic effect - efecto citopático

cytopathology - citopatología

cytosol aminopeptidase - leucil-aminopeptidasa

cytosine - citosina

D

2-D-electrophoresis - electroforesis bidimensional

dark-field microscopy - microscopía de campo oscuro

daughter-strand gap repair - reparación por recombinación

Davaine's bacillus - *Bacillus anthracis*

debranching enzyme - **1.** α -dextrina-endo-1,6- α -glucosidasa **2.** isoamilasa

decadic absorbance - absorbancia decimal

decadic attenuation - atenuancia decimal

decay constant - constante de desintegración

decolorizer - decolorante

decontamination - descontaminación

defective phage - fago defectuoso

definitive host - huésped definitivo

definitive measurement procedure - procedimiento de medida definitivo



definitive method - método definitivo

definitive value - valor definitivo

degree - grado

degree of dissociation - grado de disociación

dehydroepiandrosterone - deshidroepiandrosterona

deiodinase - ioduro-peroxidasa

deleterious mutation - mutación deletérea

deletion - delección

denaturing gradient gel electrophoresis - electroforesis en gel desnaturalizante con gradiente

denaturation - desnaturalización

density - densidad

deoxyadenosine - desoxiadenosina

deoxycorticosterone - desoxicorticosterona

11-deoxycortisol - 11-desoxicortisol

deoxycytidine - desoxicitidina

deoxyguanosine - desoxiguanosina

deoxyguanylate kinase - guanilato-cinasa

deoxyribonuclease I - desoxirribonucleasa I

deoxyribonuclease II - desoxirribonucleasa II

deoxyribonuclease S1 - nucleasa S1 de *Aspergillus*

deoxyribonucleic acid - ácido desoxirribonucleico

deoxyribonucleotide - desoxirribonucleótido



deoxyribonucleic acid - ácido desoxirribonucleico

deoxyuridine - desoxiuridina

dephosphophosphorylase kinase - fosforilasa-cinasa

depletion - 1. agotamiento. 2. reducción. 3. disminución

deprivation - 1. privación. 2. deshabituación

derepression - desrepresión

derived quantity - magnitud derivada

derived unit - unidad derivada

dermatophyte - dermatofito

20,22-desmolase - colesterol-monoxigenasa (escisora de la cadena lateral)

destabilizing protein - proteína desestabilizadora

detectability - detectabilidad

detection limit - límite de detección

detector -detector

detergent - detergente

determination - determinación

dexametasone - dexametasona

α-dextrin endo-1,6-α-glucosidase - α-dextrina-endo-1,6-α-glucosidasa

dextrin 6-α-D-glucosidase - amilo-1,6-glucosidasa

N,N'-diacetylchitobiosyl b-N-acetylglucosaminidase - manosil-glicoproteína-
endo-b-N-acetilglucosaminidasa

diacylglycerol lipase - lipoproteína-lipasa

diagnosis - diagnóstico



diagnostic sensitivity - sensibilidad diagnóstica

diagnostic specificity - especificidad diagnóstica

diakinesis - diacinesis

dialysis - diálisis

diamine oxidase - amina-oxidasa (cuprífera)

diamino oxhydrase - amina-oxidasa (cuprífera)

diaphorase - **1.** citocrom-b5-reductasa **2.** dihidrolipoamida-deshidrogenasa

dicloxacillin - dicloxacilina

dicyclomine - dicicloverina

diethylpropion - anfepramona

difference scale - escala de diferencias

differential blood count - recuento diferencial leucocitario; fórmula leucocitaria

differential count - recuento diferencial leucocitario; fórmula leucocitaria

differential diagnosis - diagnóstico diferencial

differentiation medium - medio de diferenciación

diffraction grating - red de difracción

diffusion coefficient: coeficiente de difusión

digitoxin - digitoxina

diglyceride lipase - lipoproteína-lipasa

digoxin - digoxina

7,8-dihydrobiopterin synthetase - sepiapterina-reductasa

22,23-dihydroergocalciferol - (24S)-metilcalciol



dihydrofolate reductase - dihidrofolato-reductasa

dihydrolipoamide S-acetyltransferase - dihidrolipoamida-S-acetiltransferasa

dihydrolipoamide dehydrogenase - dihidrolipoamida-deshidrogenasa

dihydrolipoyl dehydrogenase - dihidrolipoamida-deshidrogenasa

dihydropteridine reductase - dihidropteridina-reductasa

dihydropyrimidine dehydrogenase (NADP+) - dihidropirimidina-deshidrogenasa (NADP+)

dihydrotachysterol3 - dihidrocalciol

dihydrothymine dehydrogenase - dihidropirimidina-deshidrogenasa (NADP+)

dihydrouracil dehydrogenase (NADP+) - dihidropirimidina-deshidrogenasa (NADP+)

1a,25-dihydroxycholecalciferol - calcitriol

24(R),25-dihydroxycalcidiol - 24(R)-hidroxicalcidiol

1a,25-dihydroxyergocalciferol - ercalcitriol

diiodothyronine 5-deiodinase - tiroxina-desiodinasa

b-diketonase - fumarilacetoacetasa

diluent - diluyente

diluter - diluidor

dimension (of a quantity) - dimensión (de una magnitud)

dimensionless quantity - magnitud adimensional

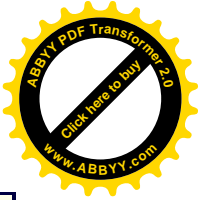
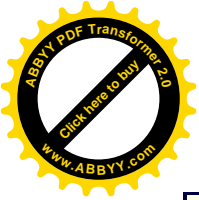
dimorphic fungi - hongo dimórfico

dipeptide hydrolase - peptidil-dipeptidasa A

dipeptidyl aminopeptidase I - dipeptidil-peptidasa I

dipeptidyl carboxypeptidase I - peptidil-dipeptidasa A

dipeptidyl-peptidase I - dipeptidil-peptidasa I



dipeptidyl transferase - dipeptidil-peptidasa I

diphenylhydantoin - fenitoína

diphosphoglycerate mutase - bisfosfoglicerato-mutasa

2,3-diphosphoglycerate mutase - bisfosfoglicerato-mutasa

2,3-diphosphoglycerate phosphatase - bisfosfoglicerato-fosfatasa

diphtheria toxin - toxina diftérica

diphtheroide - difteroide

diploid - diploide

diplotene - diplotena

dipstick - tira reactiva

dipyrone - metamizol

direct agglutination test - prueba de la aglutinación directa

direct bilirubin - bilirrubina esterificada

direct fluorescent-antibody test - prueba directa del anticuerpo fluorescente

direct fluorescent-antigen detection - detección directa del antígeno fluorescente

direct immunofluorescence test - prueba directa de inmunofluorescencia

direct wet mount - preparación en fresco

direct repeat - repetición directa

directed mutagenesis - mutagénesis dirigida

discrete flow - flujo discreto

discrete transport - transporte discreto

discrimination threshold - umbral discriminante



disease - enfermedad

disinfectant - desinfectante

disinfection - desinfección

disintegration constant - constante de desintegración

disjunction - disyunción

disopyramide - disopiramida

disorder - alteración; trastorno

dispase - aeromonolisina

dispenser - dispensador

dispersed repeat - repetición dispersa

displacement analysis - análisis por desplazamiento

dissociation constant - constante de disociación

distribution coefficient - coeficiente de distribución

distribution constant - constante de distribución

divergent promoter - promotor divergente

DNA amplification - amplificación de DNA

DNA damage - lesión del DNA

DNA-directed DNA polymerase - DNA-polimerasa dirigida por DNA

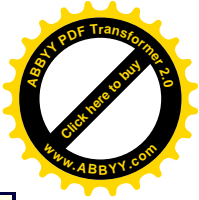
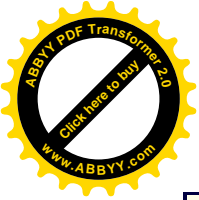
DNA-directed RNA polymerase - RNA-polimerasa dirigida por DNA

DNA ligase (ATP) - DNA-ligasa (ATP)

DNA ligase (NAD⁺) - DNA-ligasa (NAD⁺)

DNA melting - fusión del DNA

DNA mutagenic repair - reparación mutágena del DNA



DNA nucleotidylexotransferase - DNA-nucleotidilexotransferasa

DNA nucleotidyltransferase (DNA-directed) - DNA-polimerasa dirigida por DNA

DNA nucleotidyltransferase (RNA-directed) - DNA-polimerasa dirigida por RNA

DNA packaging - empaquetamiento del DNA

DNA polymerase a, b, g - DNA-polimerasa dirigida por DNA

DNA polymerase I, II, III - DNA-polimerasa dirigida por DNA

DNA repair - reparación del DNA

DNA repair enzyme - 1. DNA-ligasa (NAD⁺) 2. DNA-ligasa (ATP)

DNA restriction - restricción del DNA

DNA sequence polymorphism - polimorfismo de una secuencia de DNA

DNA topoisomerase - DNA-topoisomerasa

DNase - desoxirribonucleasa I

DNase I - desoxirribonucleasa I

DNase II - desoxirribonucleasa II

Döderlein's bacillus - actobacillus acidophilus

domain - zona

donor site - centro donador

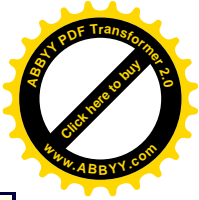
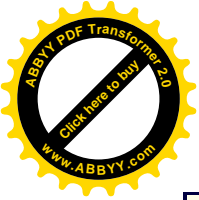
dopamine b-hydroxylase - dopamina-b-monoxigenasa

dopamine b-monooxygenase - dopamina-b-monoxigenasa

dormancy - letargo

dosage effect - efecto de la dosis

dose - dosis



dose-effect curve - curva de dosis y respuesta

dose equivalent - dosis equivalente

dot blot - transferencia en mancha

double helix - doble hélice

double diffusion test - prueba de la doble difusión

double-minute - minicromosoma

double strand - cadena doble

double-strand break repair - reparación por recombinación

double-stranded DNA - DNA bicatenario

down mutation - mutación lentificadora

down-promoter mutation - mutación lentificadora

downstream - en dirección 3'

down time - periodo improductivo

doxycycline - doxiciclina

DPNH methaemoglobin reductase - citocromo-b5-reductasa

drift - deriva

drug - 1. fármaco; medicamento. 2. droga de adicción

dry chemistry - 1. química en fase sólida. 2. reactivos en fase sólida

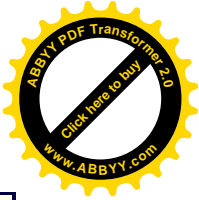
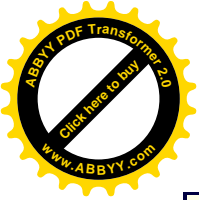
dry medium - medio seco

Ducrey's bacillus - Haemophilus ducreyi

duodenal contents - contenido duodenal

duplex - dúplex

dysgonic - disgónico



E

Eberth's bacillus - Salmonella typhi

E. coli DNA ligase - DNA-ligasa (NAD⁺)

E. coli exonuclease III - exodesoxirribonucleasa III

ECA - peptidil-dipeptidasa A

ectoparasite - ectoparásito

editor - director (de una edición)

effective concentration - concentración eficaz

effector - efector

effluent - efluente

effusion - derrame

eflectance - efectancia

EIA - enzimoinmunoanálisis

electric capacitance - capacitancia eléctrica

electric charge - carga eléctrica

electric conductance - conductancia eléctrica

electric conductivity - conductividad eléctrica

electric current - corriente eléctrica

electric current density - densidad de corriente eléctrica

electric field strength - fuerza del campo eléctrico

electric mobility - movilidad eléctrica

electric resistance - resistencia eléctrica



electric resistivity - resistividad eléctrica

electroblotting - electrotransferencia por adsorción

electrode - electrodo

electrode potencial - potencial de electrodo

electrodialysis - electrodiálisis

electro-endosmosis - elctroendósmosis

electrogravimetry - electrogravimetría

electrokaryotype - electrocariotipo

electrokinetic potential - potencial electrocinético

electrolysis - electrólisis

electrolyte - electrólito

electromotive force - fuerza electromotriz

electron microscope - microscopio electrónico

electron microscopy - microscopía electrónica

electron-transferring-flavoprotein dehydrogenase - flavoproteína-deshidrogenasa transferidora de electrones

electronvolt - electronvolt

electrophoresis - electroforesis

electrophoretic karyotype - cariotipo electroforético

electrophoretic mobility - movilidad electroforética

electroporation - electroporación

electropulsation - electropulsación

element - elemento



elementary charge - carga elemental

E ISA - elisa

elixir - elixir

elongation - elongación

eluate - eluato

eluent - eluyente

elution chromatography - cromatografía de elución

elution curve - curva de elución

emergency - urgencia

emergency laboratory - laboratorio de urgencias

emittance - emitancia

empyema - empiema

ENA - antígeno nuclear extraíble

encapsulation - encapsidación

encode - codificar

end-labeling - marcaje terminal

endo-a-N-acetylgalactosaminidase - glicopéptido-a-N-acetilgalactosaminidasa

endo-b-N-acetylglucosaminidase - manosil-glicoproteína endo-b-N- acetilglucosaminidasa

endo-N-acetylneuraminidase - endo-a-sialidasa

endocervical mucus - moco endocervical

endoenzyme - endoenzima

endogenote - endogenote



endo-1,4-b-glucanase - celulasa

endoneuraminidase - endo-a-sialidasa

endonuclease S1 (Aspergillus) - nucleasa S1 de Aspergillus

endoparasite - endoparásito

endopeptidase K - endopeptidasa K

endoproteinase Asp-N - peptidil-Asp-metaloendopeptidasa

endoproteinase Glu-C - glutamil-endopeptidasa

endoproteinase is-C - lisil-endopeptidasa

endo-a-sialidase - endo-a-sialidasa

enhancer - intensificador

enolase - fosfopiruvato-hidratasa

enoxacin - enoxacina

enrichment culture - caldo de enriquecimiento

enrichment medium - medio de enriquecimiento

enteral nutrition - nutrición enteral

enterokinase - enteropeptidasa

enteropeptidase - enteropeptidasa

enteroinvasive - enteroinvasor

enterotoxigenic - enterotoxigénico

enterotoxin - enterotoxina

enthalpy - entalpía

entitic - entítico; entésico

entity - entidad; ente



entropy - entropía

entry exclusion - bloqueo de entrada

entry site - centro aceptor

enzyme - enzima

enzyme activity - actividad enzimática

enzyme electrode - electrodo enzimático

enzyme immunoassay - enzimoimmunoanálisis

enzyme-linked immunosorbent assay - elisa

eosin-methylene blue agar - agar-eosina-cloruro de metiltioninio

eosinophil - eosinofilcito; eosinófilo

eosinophilocyte - eosinofilcito; eosinófilo

epidemiology - epidemiología

epigenetic - epigenético

epinephrine - [sustancia endógena] **1.** adrenalina. **2.** adrenalino

epinephrine - [fármaco] epinefrina

epitope - epítipo

Epstein-Barr virus - virus de Epstein-Barr

equatorial plate - placa ecuatorial

equilibrium constant - constante de equilibrio

Erlenmeyer flask - matraz de Erlenmeyer

Ermengen's bacillus - Clostridium botulinum

error - error



erythrasma - eritrasma

erythrocyte - eritrocito

erythrocyte sedimentation rate - eritrosedimentación

erythromycin - eritromicina

erythropoietin - eritropoyetina

erythro sedimentation - eritrosedimentación

esculin agar - agar-esculina

essential trace element - oligoelemento

ESR - eritrosedimentación

esterase - carboxilesterasa

estradiol-17b - estradiol-17b

estradiol 17b-dehydrogenase - estradiol-17b-deshidrogenasa

ethanol - etanol

ethanolamine kinase - etanolamina-cinasa

ethosuximide - etosuximida

ethylenediaminetetraacetate - etilendinitrilotetracetato; etilendiaminotetracetato

ethylenedinitrilotetraacetate - etilendinitrilotetracetato; etilendiaminotetracetato

eugonic - eugónico

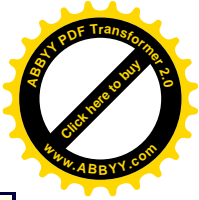
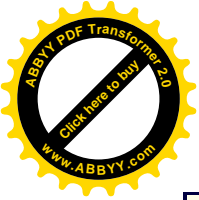
eukaryotic - eucariota

examination - 1. examen 2. exploración

excision - escisión

excitation - excitación

excitation energy - energía de excitación



exclusion chromatography - cromatografía de exclusión

exodeoxyribonuclease III - exodesoxirribonucleasa III

exoenzyme - exoenzima

exogenote - exogenote

exo-1,4-a-glucosidase - glucano-1,4-a-glucosidasa

exon - exón

3'-exonuclease - exonucleasa esplénica

5'-exonuclease - fosfodiesterasa I

exo-a-sialidase - exo-a-sialidasa

exotoxin - exotoxina

exo-1,4-b-xylosidase - xilano-1,4-b-xilosidasa

expectoration - esputo

experimental standard desviation - desviación típica experimental

expression - expresión

extended DNA - DNA expandido

external quality assessment - evaluación externa de la calidad

external quality control - control externo de la calidad

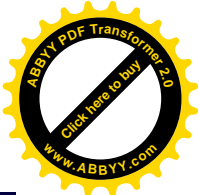
extinction - [con el significado de] absorbancia

extracellular fluid - líquido extracelular

extractable nuclear antigen - antígeno nuclear extraíble

exudate - exudado

F



F-duction - F-ducción

facultative anaerobe - anaerobio facultativo

factor - factor

factor XIIIa - proteína-glutamina-g-glutamyltransferasa

faecal culture - coprocultivo

faeces - heces

false negative - negativo falso

false positive - positivo falso

farad - farad

Faraday constant - constante de Faraday

fastidious anaerobe - anaerobio exigente

fasting - en ayunas

fatty acid - ácido graso

fatty acid thiokinase (long chain) - ácido-graso-de-cadena-larga CoA-ligasa

FBC - hemograma completo

fecal culture - coprocultivo

feces - heces

feedback - retroacción

fermentation - fermentación

fermentation test - prueba de la fermentación

ferricyanide - hexacianoferrato(III)

ferritin - ferritina



ferrochelata - ferroquelatasa

ferrocyanide - hexacianoferrato(II)

ferroxidase - ferroxidasa

Feseri's bacillus - Clostridium chauvoei

fetal hæmoglobin - hemoglobina fetal

fetal Hb - hemoglobina fetal

α-fetoprotein - α-fetoproteína

FIA - fluoroinmunoanálisis

fibrin - fibrina

fibrin degradation products - productos de degradación de la fibrina

fibrinase - plasmina

fibrinogen - fibrinógeno

fibrinogen split products - productos de la degradación del fibrinógeno

fibrinogenase - trombina

fibrinoligase - proteína-glutaminag-glutamilttransferasa

fibrinolysin - plasmina

fibroblast - fibroblasto

ficain - ficaína

ficin - ficaína

Fick's bacillus - Proteus vulgaris

field inversion gel electrophoresis - electroforesis de inversión de campo en gel

fill-in reaction - reacción de relleno

filter flask - matraz de filtración



filter hybridization - hibridación sobre filtro

filtration - filtración

fimbriae - fimbria

fingerprint - huella

fingerprinting - obtención de la huella genética

firefly luciferase - photinus-luciferina-4-monooxigenasa (hidrolizante de ATP)

fission - fisión

fistula - fístula

flagellar stain - tinción flagelar

flame atomic absorption spectrometry - espectrometría de absorción atómica de llama

flame atomic emission spectrometry - espectrometría de emisión atómica de llama

flame photometry - espectrometría de emisión atómica de llama

flanking sequence - secuencia flanqueadora

flavin mononucleotide - mononucleótido de flavina

flavin-adenine dinucleotide - dinucleótido de flavina y adenina

Flexner's bacillus - Shigella flexneri

floccose - floccoso

flow - flujo

flow cytometry - citometría de flujo

flow injection - inyección en flujo

flow rate - caudal

fluconazole - fluconazol



fluorescein - fluoresceína

fluorescence immunoassay - fluoroinmunoanálisis

fluorescence polarization immunoassay - fluoroinmunoanálisis de polarización

fluorescent-antibody test - prueba del anticuerpo fluorescente

fluorescent stain - tinción fluorescente

fluorometry - fluorimetría

flush end - extremo romo

flux - flujo

FMN reductase - NAD(P)H-deshidrogenasa (FMN)

folate - folato

folic acid - [con el significado de] folato

follicle-stimulating hormone - folitropina

follicle-stimulating-hormone-releasing factor - foliberina

follitropin - folitropina

fomite - fómite

food-borne illness - enfermedad transmitida por alimentos

footprint - impronta

footprinting - obtención de la impronta

force - fuerza

form - forma

formaldehyde - formaldehído

formate - formiato

formate tetrahydrofolate ligase - formiato tetrahidrofolato-ligasa



formimino- -glutamic transferase - glutamato-formiminotransferasa

formiminotetrahydrofolate cyclodeaminase - formiminotetrahidrofolato- ciclodesaminasa

formimino THF cyclodeiminase - formiminotetrahidrofolato-ciclodesaminasa

formyltetrahydrofolate synthetase - formiato tetrahidrofolato-ligasa

formyl THF synthetase - formiato tetrahidrofolato-ligasa

forward mutation - mutación directa

FPIA - fluoroinmunoanálisis de polarización

fractile - fráctil

fraction - fracción

frame-shift mutation - mutación del marco de lectura

free - [con el significado de] **1.** no unido a proteína **2.** no esterificado

free energy - energía libre

free fatty acids - ácidos grasos no esterificados

frequency - frecuencia

frictional coefficient - coeficiente de fricción

friction factor - factor de fricción

Friedewald's formula - fórmula de Friedewald

Friedlander's bacillus - *Klebsiella pneumoniae*

fructaldolase B - fructosa-bisfosfato-aldolasa

fructoaldolase - fructosa-bisfosfato-aldolasa

β-fructofuranosidase - β-fructofuranosidasa

fructokinase - fructocinasa



fructosamine - fructosamina

fructose - fructosa

fructose-bisphosphatase - fructosa-bisfosfatasa

fructose-bisphosphate aldolase - fructosa-bisfosfato-aldolasa

fructose-1,6-bisphosphate aldolase B - fructosa-bisfosfato-aldolasa

fructose-1,6-bisphosphate triosephosphate-lyase - fructosa-bisfosfato-aldolasa

fructose 1,6-diphosphatase - fructosa-bisfosfatasa

fructose diphosphate aldolase - fructosa-bisfosfato-aldolasa

fructose 1,6-phosphatase - fructosa-bisfosfatasa

fructose 1-phosphate aldolase - fructosa-bisfosfato-aldolasa

fructose-6-phosphate kinase - 6-fosfofructocinasa

β -fructosidase - β -fructofuranosidasa

frusemide - furosemida

FSH - folitropina

FSH-RF - foliberina

FTA - anticuerpo fluorescente antitreponémico

α -fucosidase - α -fucosidasa

full blood count - hemograma completo

fumarate hydratase - fumarato-hidratasa

fumarylacetoacetase - fumarilacetoacetasa

functional test - prueba funcional

fungus - hongo

fungemia - fungemia



furosemide - furosemida

G

galactokinase - galactocinasa

galactosamine-6-sulfatase - N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa

galactose - galactosa

galactose 1-dehydrogenase - galactosa-1-deshidrogenasa

β -galactose dehydrogenase - galactosa-1-deshidrogenasa

galactose epimerase - UDP-glucosa-4-epimerasa

galactose oxidase - galactosa-oxidasa

galactose-1-phosphate uridylyltransferase - **1.** UTP hexosa-1-fosfato- uridililtransferasa **2.** UDPglucosa hexosa-1-fosfato-uridililtransferasa

galactose-6-sulfate sulfatase - N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa

α -galactosidase - α -galactosidasa

β -galactosidase - β -galactosidasa

β -galactoside α -2,3-sialyltransferase - β -galactósido- α -2,3-sialiltransferasa

β -galactoside α -2,6-sialyltransferase - β -galactósido- α -2,6-sialiltransferasa

galactosylceramidase - galactosilceramidasa

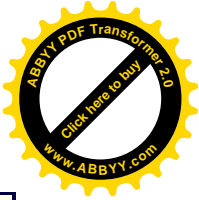
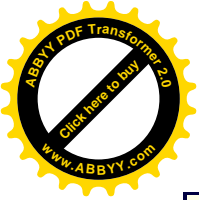
galactosylgalactosylglucosylceramidase - galactosilgalactosilglucosilceramidasa

α -galactosyl hydrolase - α -galactosidasa

galley proof - galerada

gamma GT - γ -glutamyltransferasa

gapped DNA - DNA incompleto



Gartner's bacillus - Salmonella enteritidis

gas chromatography - cromatografía en fase gaseosa; cromatografía de gases

gas-liquid chromatography - cromatografía gas-líquido

gas sterilizer - esterilizador por gas

gastric contents - contenido gástrico

gastric juice - jugo gástrico

gastricsine - gastricsina

gastrin - gastrina

gene - gen

gene bank - genoteca

gene coupling - apareamiento génico

gene deletion - delección génica

gene disruption - interrupción génica

gene dosage - dosis génica

gene library - genoteca

gene manipulation - manipulación génica

gene tagging - marcado génico

gene targeting - reconocimiento génico

gene tracking - seguimiento génico

genetic background - contexto genético

genetic code - código genético

genetic code degenerescence - redundancia del código genético

genetic engineering - ingeniería genética



genetic load - carga genética

genetic marker - marcador genético

genetic transfer - transferencia genética

genetics - genética

genome - genoma

genomic library - genoteca genómica

genomic mismatch scanning - rastreo genómico de malapareamiento

genotype - genotipo

gentamicin - gentamicina

gentiobiase - β -glucosidasa

germ - microorganismo

germ tube test medium - medio para la prueba de la germinación

gestational protein - proteína gravídica

GFR - caudal de filtración glomerular

GGT - γ -glutamyltransferasa

GH - somatotropina

Ghon-Sachs bacillus - Clostridium septicum

GH-RF - somatoliberina

Gibbs free energy - energía libre de Gibbs

Giemsa stain - tinción de Giemsa

glandular kallikrein - calicreína hística

globulin - globulina



glomerular filtrate - filtrado glomerular

glomerular filtration - filtración glomerular

glomerular filtration rate - caudal de filtración glomerular

glomeruli - glomérulos

G P - buenas prácticas de laboratorio

glucagon - glucagón

1,4-a-glucan branching enzyme - enzima ramificadora del 1,4-a-glucano

glucan 1,4-a-glucosidase - glucano-1,4-a-glucosidasa

1,4-a-glucan 6-a-glucosyltransferase - 1,4-a-glucano-6-a-glucosiltransferasa

6-glucanohydrolase - a-dextrina-endo-1,6-a-glucosidasa

glucemia - **1.** concentración de glucosa en plasma **2.** concentración de glucosa en suero

glucoamylase - glucano-1,4-a-glucosidasa

glucocerebrosidase - glucosilceramidasa

glucoinvertase - a-glucosidasa

glucokinase - glucocinasa

glucokinase - hexocinasa

gluconate kinase - gluconocinasa

gluconokinase - gluconocinasa

glucophosphomutase - fosfoglucomutasa

glucosamine-6-phosphate isomerase (glutamine-forming) - glutamina fructosa-6-fosfato-transaminasa

glucose - glucosa

glucose 1-dehydrogenase - glucosa-1-deshidrogenasa



glucose oxidase - glucosa-oxidasa

glucose oxyhydrase - glucosa-oxidasa

glucose-6-phosphatase - glucosa-6-fosfatasa

glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase - glucosa-6-fosfato-1-deshidrogenasa

glucose-6-phosphate isomerase - glucosa-6-fosfato-isomerasa

glucosephosphate isomerase - glucosa-6-fosfato-isomerasa

glucose-1-phosphate uridylyltransferase -UTP glucosa-1-fosfato-uridililtransferasa

glucose phosphomutase - fosfoglucomutasa

glucose tolerance test - prueba de tolerancia a la glucosa

α -glucosidase - α -glucosidasa

β -glucosidase - β -glucosidasa

glucosidosucrase - a-glucosidasa

glucosuria - [con el significado de] **1.** concentración de glucosa en orina **2.** excreción de glucosa en orina

glucosylceramidase- glucosilceramidasa

β -glucoronidase - β -glucoronidasa

glucoronosyltransferase - glucoronosiltransferasa

glutamate - glutamato

glutamate cysteine ligase - glutamato cisteína-ligasa

glutamate decarboxylase - glutamato-descarboxilasa

glutamate dehydrogenase - glutamato-deshidrogenasa

glutamate dehydrogenase - glutamato-deshidrogenasa [NAD(P)+]

glutamate dehydrogenase (NADP+) - glutamato-deshidrogenasa (NADP+)



glutamate dehydrogenase [NAD(P)+] - glutamato-deshidrogenasa [NAD(P)+]

glutamate formiminotransferase - glutamato-formiminotransferasa

glutamate formyltransferase - glutamato-formiminotransferasa

glutamic acid - ácido glutámico

glutamic-alanine transaminase - alanina-transaminasa

glutamic-aspartic transaminase - aspartato-transaminasa

glutamic dehydrogenase - 1. glutamato-deshidrogenasa 2. glutamato- deshidrogenasa [NAD(P)+] 3. glutamato-deshidrogenasa (NADP+)

glutamic-oxaloacetic transaminase - aspartato-transaminasa

glutamic-pyruvic transaminase - alanina-transaminasa

glutaminase - glutaminasa

glutamine - glutamina

glutamine fructose-6-phosphate transaminase - glutaminafructosa-6-fosfato- transaminasa

glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase - amidofosforribosil- transferasa

glutamine-pyruvate aminotransferase - glutaminafructosa-6-fosfato-transaminasa

g-glutamylcysteine synthase - glutamatocisteína-ligasa

γ-glutamylcysteine synthetase - glutamatocisteína-ligasa

glutamyl endopeptidase - glutamil-endopeptidasa

γ-glutamyltransferase - γ-glutamilttransferasa

glutamyl transpeptidase -γ-glutamilttransferasa

γ-glutamyl transpeptidase - γ-glutamilttransferasa

glutaryl-CoA dehydrogenase - glutaril-CoA-deshidrogenasa

glutathione S-alkyltransferase - glutati3n-transferasa



glutathione S-aralkyltransferase - glutatión-transferasa

glutathione S-aryltransferase - glutatión-transferasa

glutathione peroxidase - glutatión-peroxidasa

glutathione reductase - glutatión-reductasa (NADPH)

glutathione reductase (NADPH) - glutatión-reductasa (NADPH)

glutathione synthase - glutatión-sintasa

glutathione synthetase - glutatión-sintasa

glutathione transferase - glutatión-transferasa

glutethimide - glutetimida

N-glycanase - péptido-N4-(N-acetil- β -glucosaminil)asparragina-amidasa

O-glycan peptide hydrolase - glicopéptido- α -N-acetilgalactosaminidasa

glycated hemoglobin - glicohemoglobina

glycemia - 1. concentración de glucosa en plasma 2. concentración de glucosa en suero

glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase- gliceraldehído-3-fosfato- deshidrogenasa

glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NADP⁺) (phosphorylating) -
gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (NADP⁺) (fosforilante)

glycerate dehydrogenase - glicerato-deshidrogenasa

glycerate phosphomutase - bisfosfoglicerato-mutasa

glyceric dehydrogenase - glicerato-deshidrogenasa

glycerol dehydrogenase - glicerol-deshidrogenasa

glycerol kinase - glicerol-cinasa

glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺) - glicerol-3-fosfato-deshidrogenasa (NAD⁺)

glycerol-3-phosphate oxidase - glicerol-3-fosfato-oxidasa



glycerophosphatase - 1. fosfatasa ácida 2. fosfatasa alcalina

α -glycerophosphate dehydrogenase - glicerol-3-fosfato-deshidrogenasa (NAD⁺)

glycine - glicina

glycine decarboxylase - glicina-deshidrogenasa (descarboxilante)

glycine dehydrogenase (decarboxylating) - glicina-deshidrogenasa (descarboxilante)

glycine synthase - 1. aminometiltransferasa 2. glicina-deshidrogenasa (descarboxilante)

glycogenase - 1. α -amilasa 2. β -amilasa

glycogen phosphorylase - glucógeno-fosforilasa

glycogen phosphorylase kinase - fosforilasa-cinasa

glycogen synthase - glucógeno-sintasa

glycogen synthetase - glucógeno-sintasa

glycohemoglobin - glicohemoglobina

glycolaldehydetransferase - transcetolasa

glycopeptidase - péptido-N 4-(N-acetil- β -glucosaminil)asparragina-amidasa

glycopeptide α -N-acetylgalactosaminidase - glicopéptido- α -N- acetilgalacto- saminidasa

glycopeptide N-glycosidase - péptido-N 4-(N-acetil- β -glucosaminil) asparragina- amidasa

glycoprotein 4- β -galactosyl-transferase - β -N-acetilglucosaminilglicopéptido- β - 1, 4-galactosiltransferasa

O-glycosidase - glicopéptido- α -N-acetilgalactosaminidasa

glycosuria - [con el significado de] 1. concentración de glucosa en orina 2. excreción de glucosa en orina

glycosylated hemoglobin - glicohemoglobina

glyoxalase - lactoilglutación-liasa

glyoxilate reductase - glioxilato-reductasa



glyoxylate reductase - glicerato-deshidrogenasa

gonadoliberin - gonadoliberina

gonadorelin - gonadorelina

gonadotropin - gonadotropina

gonadotropin hormone - gonadotropina

gonadotropin-releasing factor - gonadoliberina

gonococcus - Neisseria gonorrhoeae

GOT - aspartato-aminotransferasa

GPT - alanina-aminotransferasa

Gram-negative - gramnegativo

Gram-positive - grampositivo

Gram stain - tinción de Gram

granulocyte - granulocito

gratuitous inducer - inductor gratuito

gravimetry - gravimetría

gray - gray

gross mutation - mutación voluminosa

growth factor - factor de crecimiento

growth hormone - somatotropina

growth hormone-releasing factor - somatoliberina

gGT - g-glutamilttransferasa

γ-GTP - γ-glutamilttransferasa



GTP cyclohydrolase I - GTP-ciclohidrolasa I

guanase - guanina-desaminasa

guanine - guanina

guanine aminase - guanina-desaminasa

guanine deaminase - guanina-desaminasa

guanine phosphoribosyltransferase - hipoxantina-fosforribosiltransferasa

guanosine - guanosina

guanosine 5'-diphosphate - 5'-difosfato de guanosina

guanosine-5'-monophosphate kinase - guanilato-cinasa

guanosine 5'-phosphate - 5'-fosfato de guanosina

guanosine 5'-triphosphate - 5'-trifosfato de guanosina

guanylate kinase - guanilato-cinasa

H

hæm - hemo

hæm synthase - ferroquelatasa

hæm synthetase - ferroquelatasa

hæmatology - hematología

hæmeprotein - hemoproteína

hæmoglobin - hemoglobina

hæmoglobin A1 - glicohemoglobina

hæmolysis - hemólisis

hæmolyzed blood - sangre hemolisada



Hageman factor - factor XII de la coagulación

Hageman factor (activated) - factor XIIa de la coagulación

hair - pelo; cabello

hair penetration test - prueba de la penetración capilar

hairpin - horquilla

hairpin loop - horquilla

half-life - semivida

Hanks buffered salts solution - solución tamponada de sales de Hanks

Hansen's bacillus - Mycobacterium leprae

haploid - haploide

haplotype - haplotipo

haptén - hapteno

haptoglobin - haptoglobina

HD -colesterol - colesterol de lipoproteínas de alta densidad; colesterol de HD

heat capacity - capacidad térmica

heat shock - choque térmico

heat sterilization - esterilización por calor

He a cell - célula He a

helix-turn-helix - hélice-vuelta-hélice

helminth - helminto

helper - auxiliar

hem - hemo

hem synthase - ferroquelatasa



hem synthetase - ferroquelatasa

hemacytometer chamber - cámara hemocitométrica

hemagglutination - hemaglutinación

hemagglutination inhibition - inhibición de la hemaglutinación

hemagglutination inhibition test - prueba de la inhibición de la hemaglutinación

hematology - hematología

hematoxilyn and eosin stain - tinción con hematoxilina y eosina

hemeprotein - hemoproteína

hemoglobin - hemoglobina

hemoglobin A1 - glicohemoglobina

hemolysis - hemólisis

hemolyzed blood - sangre hemolisada

Henderson-Hasselbach equation - ecuación de Henderson-Hasselbach

henry - henry

heparan- α -glucosaminide N-acetyltransferase - heparán- α -glucosaminida-N - acetiltransferasa

heparan sulfamatase - N-sulfoglucosamina-sulfohidrolasa

heparan N-sulfamidase - N-sulfoglucosamina-sulfohidrolasa

heparan N-sulfatase - N-sulfoglucosamina-sulfohidrolasa

heparan sulfate sulfatase - N-sulfoglucosamina-sulfohidrolasa

heparin - heparina

heparinized blood - sangre heparinizada

heparinized syringe - jeringuilla heparinizada



hepatic clearance - depuración hepática

hepatitis A virus - virus de la hepatitis A

hepatitis B virus - virus de la hepatitis B

hepatitis C virus - virus de la hepatitis C

hepatitis B core antigen - antígeno nuclear de la hepatitis B

hertz - hertz

heteroduplex analysis - análisis heterodúplex

heteroduplex mapping - cartografía heterodúplex

heterogeneous immunoassay - inmunoanálisis heterogéneo

heterogenote - heterogenote

heteropycnosis - heteropicnosis

heteroscedaticity - heterocedasticidad

heterothroph - heterótrofo

heterozygote - heterocigoto

hexachlorophene - hexaclorofeno

hexokinase - hexocinasa

hexokinase I - hexocinasa

hexokinase D - hexocinasa

hexokinase type IV - hexocinasa

hexosaminidase - β -N-acetilhexosaminidasa

hexosediphosphatase - fructosa-bisfosfatasa

hexosephosphate aminotransferase - glutaminafructosa-6-fosfato-transaminasa



hexosephosphate isomerase - glucosa-6-fosfato-isomerasa

hexose-1-phosphate uridylyltransferase - UDP-glucosa-hexosa-1-fosfato- uridililtransferasa

HGF - glucagón

high-performance liquid chromatography - cromatografía en fase líquida de alta eficacia; cromatografía de líquidos de alta eficacia

high-pressure liquid chromatography - cromatografía en fase líquida de alta eficacia; cromatografía de líquidos de alta eficacia

hippurate test - prueba del hipurato

histaminase - amina-oxidasa (cuprífera)

histidase - histidina-amoniaco-liasa

histidinase - histidina-amoniaco-liasa

histidine - histidina

histidine ammonia-lyase - histidina-amoniaco-liasa

histidine a-deaminase - histidina-amoniaco-liasa

histochemistry - histoquímica

histocompatibility test - prueba de histocompatibilidad

histology - histología

histone - histona

histopathology - histopatología

HMG-CoA lyase - hidroximetilglutaril-CoA-liasa

holocarboxylase synthetase - biotina[propionil-CoA-carboxilasa (hidrolizante de ATP)-ligasa

homeobox - homeosecuencia

homocarnosinase - X-His-dipeptidasa



homoduplex - homodúplex

homogeneous immunoassay - inmunoanálisis homogéneo

homogenote - homogenote

homogentisate 1,2-dioxygenase - homogentisato-1,2-dioxigenasa

homogentisate oxygenase - homogentisato-1,2-dioxigenasa

homogentisicase - homogentisato-1,2-dioxigenasa

homology - homología

homoscedasticity - homocedasticidad

homoserine deaminase - cistationina-g-liasa

homoserine dehydratase - cistationina-g-liasa

homovanillic acid - 4-hidroxi-3-metoxifenilacetato

homozygote - homocigoto

Hormann's bacillus - *Corynebacterium pseudodiphthericum*

hormone - hormona

host cell - célula hospedadora

host computer - ordenador central

hot spot - punto caliente

housekeeping gene - gen de mantenimiento

HP C - cromatografía en fase líquida de alta eficacia; cromatografía de líquidos de alta eficacia

human immunodeficiency virus - virus de la inmunodeficiencia humana; virus del sida

human leukocyte antigen - antígeno leucocitario humano

human menopausal gonadotropin - urogonadotropina



humidophilic - humidofílico

hyaluronate lyase - hialuronato liasa

hyaluronidase - **1.** hialuronato-liasa **2.** hialuronoglucosaminidasa **3.** hialurono- glucoronidasa

hyaluronoglucosaminidase - hialuronoglucosaminidasa

hyaluronoglucosidase - hialuronoglucosaminidasa

hyaluronoglucoronidase - hialuronoglucoronidasa

hybridization - hibridación

hybridoma - hibridoma

hydrogen carbonate - hidrogenocarbonato

hydrogenion - ion hidrógeno

hydrolisis - hidrólisis

3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase - 3-hidroxiacil-CoA-deshidrogenasa

β -hydroxyacyl dehydrogenase - 3-hidroxiacil-CoA-deshidrogenasa

hydroxyacylglutathione hydrolase - hidroxiacilglutación-hidrolasa

S-(hydroxyalkyl)-glutathione lyase - glutatión-transferasa

3-hydroxybutyrate dehydrogenase - 3-hidroxibutirato-deshidrogenasa

β -hydroxybutyric acid - **1.** ácido 2-hidroxibutírico. **2.** 2-hidroxibutirato

24(R)-hydroxycalcidiol - 24(R)-hidroxicalcidiol

25-hydroxycholecalciferol - calcidiol

5-hydroxyindolylacetate - [ácido 5-hidroxindolilacético más ion 5-hidroxindoli- acetato]
5-hidroxindolilacetato

5-hydroxyindolylacetic acid - ácido 5-hidroxindolilacético

5-hydroxyindolylacetic acid - [cuando en realidad hace referencia a ácido
5-hidroxindolilacético más ion 5- hidroxindolilacetato] 5-hidroxindolilacetato



3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase - 3-hidroxisobutiril-CoA-hidrolasa

21-hydroxylase - esteroide-21-monoxigenasa

17a-hydroxylase - esteroide-17a-monoxigenasa

11b-hydroxylase - esteroide-11b-monoxigenasa

11b/18-hydroxylase - esteroide-11b-monoxigenasa

4-hydroxy-3-methoxymandelate - [ácido 4-hidroxi-3-metoximandélico más ion 4-hidroxi-3-metoximandelato] 4-hidroxi-3-metoximandelato

4-hydroxy-3-methoxymandelic acid - ácido 4-hidroxi-3-metoximandélico

4-hydroxy-3-methoxymandelic acid - [cuando en realidad hace referencia a ácido 4-hidroxi-3-metoximandélico más ion 4-HIDROXI-3-METOXIMANDE ATO] 4-hidroxi-3-metoximandelato

4-hydroxy-3-methoxyphenylacetate - 4-hidroxi-3-metoxifenilacetato

4-hydroxy-3-methoxyphenylacetate acid - ácido 4-hidroxi-3-metoxifenilacético

hydroxymethylbilane synthase - hidroximetilbilano-sintasa

hydroxymethylglutaryl-CoA lyase - hidroximetilglutaril-CoA-liasa

hydroxymethylglutaryl-CoA reductase (NADPH) - hidroximetilglutaril-CoA- reductasa (NADPH)

4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase - 4-hidroxifenilpiruvato-dioxigenasa

17a-hydroxyprogesterone aldolase - 17a-hidroxiprogesterona-aldolasa

17a-hydroxyprogesterone C-17/C-20 lyase - 17a-hidroxiprogesterona-aldolasa

hydroxyproline - hidroxiprolina

(R)-20-hydroxysteroid dehydrogenase - 3a(ó 20b)-hidroxiesteroide- deshidrogenasa

20a-hydroxysteroid dehydrogenase - estradiol-17b-deshidrogenasa

3a(or 20b)-hydroxysteroid dehydrogenase - 3a(ó 20b)-hidroxiesteroide- deshidrogenasa



3b-hydroxy-D5-steroid dehydrogenase - 3b-hidroxi-D5-esteroide-deshidrogenasa

3(or 17)b-hydroxysteroid dehydrogenase - 3(ó 17)b-hidroxiesteroide- deshidrogenasa

17b-hydroxysteroid dehydrogenase - testosterona-17b-deshidrogenasa (NADP+)

17b,20a-hydroxysteroid dehydrogenase - estradiol-17b-deshidrogenasa

3a-hydroxysteroid dehydrogenase (B-specific) - 3a-hidroxiesteroide- deshidrogenasa (B-específica)

hyperglycemic factor - glucagón

hypertonic - hipertónico -ica

hypha - hifa

hypophysis - hipófisis

hypthalamus - hipotálamo

hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase - hipoxantina-fosforribosil- transferasa

hypoxanthine oxidase - xantina-oxidasa

hypoxanthine phosphoribosyltransferase - hipoxantina-fosforribosiltransferasa

I

ICSH - lutropina

identification process - proceso de identificación

identification system - sistema de identificación

-iditol 2-dehydrogenase - -iditol-2-deshidrogenasa

iduronate 2-sulfatase - iduronato-2-sulfatasa

-iduronidase - -iduronidasa

illuminance - iluminancia

imidodipeptidase - X-Pro-dipeptidasa



imipenem - imipenem

immersion lens - objetivo de inmersión

immersion objective - objetivo de inmersión

immersion oil - aceite de inmersión

immune - **1.** inmunitario -ia **2.** inmunológico -ica

immune adherence - inmunoadherencia

immune complex - inmunocomplejo

immune response - respuesta inmunitaria

immune system - sistema inmunitario

immunoabsorbent column - columna inmunoabsorbente

immunoassay - inmunoanálisis

immunoblot - inmunotransferencia

immunoblotting - inmunotransferencia

immunochemistry - inmunoquímica

immunodiffusion - inmunodifusión

immunodiffusion radial - inmunodifusión radial

immuno-electrodiffusion - inmuno-electrodifusión

immuno-electrophoresis - inmuno-electroforesis

immuno-electrophoretic precipitation - precipitación inmuno-electroforética

immunofixation - inmunofijación

immunofluorescence - inmunofluorescencia

immunoglobulin - inmunoglobulina



immunoglobulin A - inmunoglobulina A

immunoglobulin D - inmunoglobulina D

immunoglobulin E - inmunoglobulina E

immunoglobulin G - inmunoglobulina G

immunoglobulin M - inmunoglobulina M

immunology - inmunología

immunoperoxidase assay - prueba de la inmunoperoxidasa

immunoprecipitation - inmunoprecipitación

immunoradiometry - inmunorradiometría

IMPaspartate ligase - adenilosuccinato-sintasa

impedance - impedancia

IMP pyrophosphorylase - hipoxantina-fosforribosiltransferasa

imprecision - imprecisión

imprecision profile - perfil de imprecisión

imulus test - prueba del imulus

in situ hybridization - hibridación in situ

in vitro - in vitro

in vitro diagnostic medical device- dispositivo médico para diagnóstico in vitro

in vivo - in vivo

inaccuracy - inexactitud

incidence - incidencia

inclusion body - cuerpo de inclusión

India ink - tinta china



India ink mount - preparación con tinta china

indicator electrode - electrodo indicador

indigenous flora - flora indígena

indirect agglutination test - prueba indirecta de la aglutinación

indirect bilirubin - bilirrubina no esterificada

indirect fluorescent-antibody test - prueba indirecta del anticuerpo fluorescente

indirect hemagglutination test - prueba indirecta de la hemaglutinación

indole - indol

inducer - inductor

induction - inducción

infection - infección

infectious waste - desechos infecciosos

influence quantity - magnitud influyente

infusion - infusión

inhibin - inhibina

inhibition - inhibición

inhibitory concentration - concentración inhibidora

inhibitory quotient - cociente inhibidor

initiator site - centro iniciador

inorganic phosphorus - [con el significado de] fosfato no esterificado

inorganic pyrophosphatase - pirofosfatasa inorgánica

inosine 5'-diphosphate - 5'-difosfato de inosina



inosine 5'-phosphate - 5'-fosfato de inosina

inosine phosphorylase - purina-nucleósido-fosforilasa

inosine 5'-triphosphate - 5'-trifosfato de inosina

inpatient - paciente hospitalizado

input rate - velocidad de procesamiento

insert - inserto

insertion mutation - mutación por inserción

interstitial cell-stimulating hormone - lutropina

instrument - instrumento

instrumental dependability - seguridad instrumental

instrumentation>instrum>instrumentación

insulin - insulina

insulin-like growth factor I - factor de crecimiento insulinoide I

insulin-like growth factor II - factor de crecimiento insulinoide II

intact parathyrin - paratirina

intercalating agent - agente intercalable

interchangeability - intercambiabilidad

interference - interferencia

interference filter - filtro interferencial

inter-individual biological variability - variabilidad biológica interindividual

inter-individual biological variation - variación biológica interindividual

interlaboratory imprecision - imprecisión entre laboratorios

interlaboratory quality control - control de la calidad entre laboratorios



intermediate host - hospedero intermedio

internal energy - energía interna

internal quality control - control interno de la calidad

international normalized ratio - razón normalizada internacional

internacional standard - **1.** patrón internacional. **2.** norma internacional

international unit - unidad internacional

interspersed repetitive sequence - secuencia repetitiva intercalada

interrupted mating - acoplamiento interrumpido

interstitial collagenase - colagenasa intersticial

interval scale - escala de intervalo

intervening sequence - secuencia interpuesta

intestine - intestino

intracellular fluid - líquido intracelular

intra-individual biological variability - variabilidad biológica intraindividual

intra-individual biological variation - variación biológica intraindividual

intron - intrón

intron splicing - eliminación de intrones

inuline - inulina

invasive procedure - procedimiento cruento

inversion loop - lazo de inversión

invertase - β -fructofuranosidasa

iodide peroxidase - yoduro-peroxidasa



iodinase - ioduro-peroxidasa

iodotyrosine dehalogenase - ioduro-peroxidasa

iodotyrosine deiodase - ioduro-peroxidasa

ion exchange chromatography - cromatografía de intercambio iónico

ion par - par iónico

ionic activity - actividad iónica

ionic activity coefficient - coeficiente de actividad iónica

ionic strength - fuerza iónica

ionized calcium - ion calcio

iontophoresis - iontoforesis

iron - hierro

irradiance - irradiancia

isoaccepting tRNA - tRNA isoaceptor

isoamylase - isoamilasa

isocitrate dehydrogenase (NADP+) - isocitrato-deshidrogenasa (NADP+)

isoelectrical point - punto isoeléctrico

isoelectrofocusing - isoelectroenfoque

isoenzyme - isoenzima

isoform - isoforma

isolation medium - medio de aislamiento

isoleucine - isoleucina

isomaltase - *oligo-1,6-glucosidasa*

isoniazid - isoniazida



isopropyl alcohol - 2-propanol; alcohol isopropílico

isoproterenol - isoprenalina

isopycnose - isopicnosis

isoschizomer - isoesquizómero

isotonic - isotónico

isotope - isótopo

isovaleric acid CoA dehydrogenase - isovaleril-CoA-deshidrogenasa

isovaleryl-CoA dehydrogenase - isovaleril-CoA-deshidrogenasa

isovitamin D3 - (5E)-isocalciol

isozyme - isoenzima

iteron - iterón

IU - unidad internacional

J

Johne's bacillus - Mycobacterium paratuberculosis

joint fluid - líquido sinovial

joule - joule

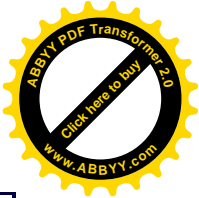
jumping gene - gen saltador

K

kalemia - 1. concentración de ion potasio en plasma 2. concentración de ion potasio en suero

kaliuria - 1. concentración de ion potasio en orina 2. excreción de ion potasio en orina

kanamycin - kanamicina



karyokinesis - cariocinesis

katacalcin - catacalcina

katal - catal

kelvin - kelvin

keratan-sulfate endo-1,4-b-galactosidase - queratán-sulfato-endo-1,4-β- galactosidasa

a-ketoacid carboxylase - piruvato-descarboxilasa

3-ketoacid CoA-transferase - 3-oxoácido-CoA-transferasa

keto acid decarboxylase - 3-metil-2-oxobutanoato-deshidrogenasa (lipoamida)

3-ketoacyl-CoA thiolase - acetil-CoA-C-aciltransferasa

ketoconazole - ketoconazol

ketohexokinase - cetohehexocinasa

ketone-aldehyde mutase - lactoílglutación-liasa

ketone bodies - [cuando en realidad se hace referencia a acetona más acetoacetato]
metilcetona

ketone body - compuesto cetónico

β-keto-reductase - 3-hidroxiacil-CoA-deshidrogenasa

17-ketosteroid reductase - testosterona-17b-deshidrogenasa (NADP+)

17-ketosteroid - 17-oxoesteroide

3-ketothiolase - acetil-CoA-C-aciltransferasa

β-ketothiolase -acetil-CoA-C-aciltransferasa

kidney - riñón

kidney kallikrein - calicreína hística

killer DNA - DNA matador



kind-of-property - tipo de propiedad

kind-of-quantity - tipo de magnitud

kinetic energy - energía cinética

King medium - medio de King

kinin - cinina

kinin-9 - bradicinina

kinin-10 - calidina

kininase II - peptidil-dipeptidasa A

kininogenin - calicreína plasmática

Kinyoun acid-fast stain - tinción de ácidorresistencia de Kinyoun

kit - equipo de reactivos

Kitasato's bacillus - Yersinia pestis

Klebs- öffler's bacillus - Corynebacterium diphteriae

Klenow enzyme - DNA-polimerasa dirigida por DNA

Koch's bacillus - Mycobacterium tuberculosis

Koch-Weeks bacillus - Haemophilus influenzae

Köhler illumination - iluminación de Köhler

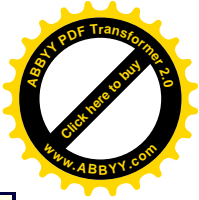
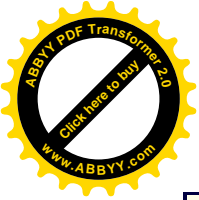
Kornberg polymerase - DNA-polimerasa dirigida por DNA

Kovacs oxidase test - prueba de la oxidasa de Kovacs

Kruse-Sonne's bacillus - Shigella sonnei

kynureninase - cinureninasa

L



labelling - marcado

laboratory medicine - ciencias de laboratorio clínico

laboratory test - 1. procedimiento de medida 2. procedimiento analítico 3. análisis 4. prueba analítica 5. prueba de laboratorio 6. magnitud

lacked blood - sangre hemolisada

lacrimal fluid - secreción lacrimal

β -lactamase - β -lactamasa

lactase - lactasa

lactase - β -galactosidasa

lactate - [ácido láctico más ion lactato] lactato

D-lactate dehydrogenase - D-lactato-deshidrogenasa

-lactate dehydrogenase - -lactato-deshidrogenasa

lactate 2-monooxygenase - lactato-2-monooxygenasa

lactate oxidase - lactato-2-monooxygenasa

lactic acid - ácido láctico

lactic acid - [cuando en realidad hace referencia a ácido láctico más ion lactato] lactato

lactic acid dehydrogenase - 1. D-lactato-deshidrogenasa 2. -lactato- deshidrogenasa

lactophenol mounting solution - solución de montaje de lactofenol

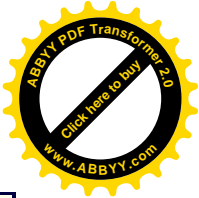
lactose synthase - lactosa-sintasa

lactotropic hormone - prolactina

lactotropin - prolactina

lactoylglutathione lyase - lactoilglutación-liasa

lag phase - fase de latencia



lagging strand - cadena discontinua

lambda - [con el significado de] microlitro

laminar flow - flujo laminar

lampbrush chromosome - cromosoma plumoso

lariat - lazo

latex agglutination test - prueba de aglutinación con látex

latex fixation test - prueba de fijación con látex

CR : reacción en cadena por la ligasa

D1 : isoenzima 1 de la -lactato-deshidrogenasa

DH : -lactato-deshidrogenasa

D cholesterol: colesterol de lipoproteínas de baja densidad; colesterol de D

lead - plomo

leader sequence - secuencia guía

leading strand - cadena adelantada

leaky mutation - mutación parcial

lecithin - 3-sn-fosfatidilcolina

lecithinase A - fosfolipasa A2

lecithinase C - fosfolipasa C

lecithinase D - fosfolipasa D

lecithincholesterol acyltransferase - fosfatidilcolinaesterol-O-aciltransferasa

lecture - conferencia; disertación

length - longitud

leptotene - leptotena

lethal concentration - concentración letal



leucine - leucina

leucine aminopeptidase - leucil-aminopeptidasa

leucine transaminase - leucina-transaminasa

leucyl aminopeptidase - leucil-aminopeptidasa

leucyl peptidase - leucil-aminopeptidasa

leukocyte - leucocito

leukocyte elastase - elastasa-leucocitaria

level - nivel

level - 1. concentración. 2. contenido

H - lutropina

H/FSH-RF - gonadoliberina

H-RF - luliberina

library - biblioteca

lidocaine - lidocaína

ligand - ligando

ligase chain reaction - reacción en cadena por la ligasa

ligation - ligación

light microscope - microscopio óptico

lignocaine - lidocaína

lignoceroyl-CoA synthase - ácido graso de cadena largaCoA-ligasa

likelihood ratio - razón de verosimilitud

limit dextrinase - 1. a-dextrina-endo-1,6-a-glucosidasa 2. oligo-1,6-glucosidasa

limit of detection - límite de detección

lincomycin - lincomicina



lineality range - intervalo analítico

linear absorption coefficient - coeficiente de absorción lineal

linear attenuation coefficient - coeficiente de atenuación lineal

linear decadic absorption coefficient - coeficiente de absorción decimal lineal

linear decadic attenuation coefficient - coeficiente de atenuación decimal lineal

linearity - 1. rectilinealidad 2. linealidad

lineic - lineico -ica

lineic absorbance - absorbancia lineica

linkage - ligamiento

linked gene - gen ligado

linker - ligador

linking number - número total de vueltas

lipase - triacilglicerol-lipasa

lipemia - 1. concentración de lípido en plasma 2. concentración de lípido en suero

lipid - lípido

lipoamide dehydrogenase - dihidrolipoamida-deshidrogenasa

lipoamide reductase (NADH) - dihidrolipoamida-deshidrogenasa

lipoate acetyltransferase - dihidrolipoamida-acetiltransferasa

lipophosphodiesterase I - fosfolipasa C

lipophosphodiesterase II - fosfolipasa D

lipoprotein (a) - lipoproteína (a)

lipoprotein lipase - lipoproteína-lipasa



lipotropic hormone - lipotropina

lipoxidase - lipoxigenasa

lipoxygenase - lipoxigenasa

lipoyl dehydrogenase - dihidrolipoamida-deshidrogenasa

liquid chromatography - cromatografía en fase líquida; cromatografía de líquidos

liquid culture medium - medio de cultivo líquido

liquid enrichment medium - medio líquido de enriquecimiento

liquid-gel chromatography - cromatografía líquido-gel

liquid-liquid chromatography - cromatografía líquido-líquido

liquid-liquid extraction - extracción líquido-líquido

liquid scintillation counter - contador de centelleo líquido

lithium - litio

lithium ion - ion litio

lithocholic acid - ácido litocólico

liver - hígado

liver cell (cultured) - células hepáticas (cultivadas)

locus - locus

lod score - lod

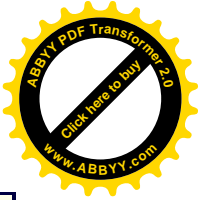
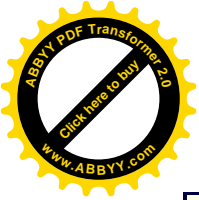
Löffler's bacillus - *Corynebacterium diphteriae*

logit - logit

lomefloxacin - lomefloxacina

long-chain-acyl-CoA dehydrogenase - acilo de cadena larga-CoA-deshidrogenasa

long-chain-fatty-acidCoA ligase - ácido graso de cadena largaCoA-ligasa



longitudinal comparision - comparación longitudinal

loop - asa

Lowenstein Jensen medium - medio de Lowenstein-Jensen

lozenge - pastilla

PH : lipotropina

RF : luliberina

Lugol's solution - solución de ugot

luliberin - luliberina

lumen - luz

luminiscence - luminiscencia

luminiscence immunoassay - luminoinmunoanálisis

luminoimmunoassay - luminoinmunoanálisis

luminometer - luminómetro

luminous flux - flujo luminoso

luminous intensity - intensidad luminosa

lupus anticoagulant - anticoagulante lúpico

luteinizing hormone - lutropina

luteinizing hormone-releasing factor - luliberina

lutropin - lutropina

lux - lux

lymphoblast - linfoblasto

lymphocyte - linfocito



lysine - lisina

lysine and ornithine broth - caldo con lisina y ornitina

lysine dehydrogenase - lisina-deshidrogenasa

lysine hydroxylase - procolágeno-lisina-5-dioxigenasa

lysine iron agar - agar con hierro y lisina

lysine-ketoglutarate reductase - sacaropina-deshidrogenasa (NAD⁺, formadora de -lisina)

lysine:α-ketoglutarate reductase - sacaropina-deshidrogenasa (NAD⁺, formadora de -lisina)

-lysine oxidase - -lisina-oxidasa

lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase - procolágeno-lisina-5-dioxigenasa

lysine2-oxoglutarate reductase - sacaropina-deshidrogenasa (NAD⁺, formadora de -lisina)

lysis - lisis

lysogenic - lisogénico -ica

lysosomal carboxypeptidase A - carboxipeptidasa de tipo serina

lysosomal elastase - elastasa leucocitaria

lysosomal α-glucosidase - glucano-1,4-a-glucosidasa

lysozyme - lisozima

lysyl endopeptidase - lisil-endorpeptidasa

lysyl hydroxylase - procolágeno-lisina-5-dioxigenasa

M

MacConkey agar - agar de MacConkey

macroconidia - macroconidia

macroglobulin - macroglobulina



macromolecule - macromolécula

magnesium - magnesio

magnesium ion - ion magnesio

magnitude - cuantía

major histocompatibility complex - complejo principal de histocompatibilidad

malate dehydrogenase - malato-deshidrogenasa

malic dehydrogenase - malato-deshidrogenasa

maltase - α -glucosidasa

maltase-glucoamylase - α -glucosidasa

mammotropic hormone - prolactina

mammotropin - prolactina

mannitol salt agar - agar con manitol y sal

mannose - manosa

mannose-6-phosphate isomerase - manosa-6-fosfato-isomerasa

α -mannosidase - α -manosidasa

mannosyl-glycoprotein endo- β -N-acetylglucosaminidase - manosil-glicoproteína-endo- β -N-acetilglucosaminidasa

Mantoux test - prueba de la tuberculina

manual - manual

manufacturer - fabricante

mapping - 1. cartografía. 2. aplicación (matemática); función (matemática)

marketing - mercadotecnia

mass - masa



mass concentration - concentración de masa

mass fraction - fracción de masa

mass rate - caudal de masa

mass number - número de masa

mass spectrometer - espectrómetro de masas

mass spectrometry - espectrometría de masas

massic - másico -ica

mating - apareamiento

matrix - matriz

matrix metalloproteinase 1 - collagenasa intersticial

maximal allowable error - máximo error tolerable

MC antigen - antígeno MC

mca - anticuerpo monoclonal

McFarland nephelometer - nefelómetro de McFarland

mean - media (aritmética); promedio

mean lethal concentration - concentración letal media

mean life - vida media

mean time - tiempo medio

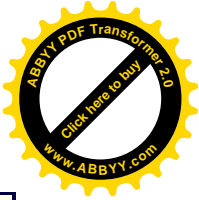
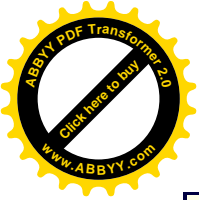
measles virus - virus del sarampión

measurement - medida; medición

measurement procedure - procedimiento de medida

measurement range - intervalo de medida

measuring curve - curva de medida



measuring function - función de medida

measuring instrument - instrumento de medida

measuring interval - intervalo de medida

measuring system - sistema de medida

mechanization - mecanización

meconium - meconio

median - mediana

median effective concentration - concentración eficaz mediana

median lethal concentration - concentración letal mediana

medical device - producto sanitario

megakaryoblast - megacarioblasto

megakaryocyte - megacariocito

melanocyte-stimulating hormone - melanotropina

melanotropin release-inhibiting factor - melanostatina

melanotropin-releasing factor - melanoliberina

melibiase - a-galactosidasa

membrane alanyl aminopeptidase - alanil-aminopeptidasa de membrana

membrane aminopeptidase I - alanil-aminopeptidasa de membrana

meperidine - petidina

mephobarbital - metilfenobarbital

messenger ribonucleic acid - ácido ribonucleico mensajero

messenger RNA - RNA mensajero



mesurand - mesurando

meta-analysis - metanálisis

metabolism - metabolismo

metabolite - metabolito

metamyelocyte - metamielocito

metanephrine - metanefrina

metaproterenol - orciprenalina

metaphase plate - placa metafásica

methaemoglobin reductase - citocromo-b5-reductasa

methanol - metanol

methemoglobin - metahemoglobina

methenamine-silver stain - tinción con metenamina y plata

methicillin - meticilina

methimazole - tiamazol

methione - metiona

-methioninase - metionina-g-liasa

methionine - metionina

methionine adenosyltransferase - metionina-adenosiltransferasa

methionine γ -lyase - metionina- γ -liasa

methionine synthase - 5-metiltetrahidrofolatohomocisteína-S-metiltransferasa

method of measurement - método de medición

methotrexate - metotrexato

3-methoxyadrenalin - 3-metoxiadrenalina



3-methoxyadrenalin - [cuando en realidad hace referencia a 3-metoxiadrenalina más ion 3-metoxiadrenalinio] 3-metoxiadrenalinio

3-methoxyadrenalinium - [3-metoxiadrenalina más ion 3-metoxiadrenalinio] 3-metoxiadrenalinio

3-methoxynoradrenalin - 3-metoxinoradrenalina

3-methoxynoradrenalin - [cuando en realidad hace referencia a 3-metoxinoradrenalina más ion 3-metoxinoradrenalinio] 3-metoxinoradrenalinio

3-methoxynoradrenalinium - [3-metoxinoradrenalina más ion 3-metoxinoradrenalinio] 3-metoxinoradrenalinio

methyl red test - prueba del rojo de metilo

methyl-cysteine - mecisteína

methylcellulose - hipromelosa

2-methylacetoacetyl-CoA thiolase - acetil-CoA-C-aciltransferasa

methylbutyrase - carboxilesterasa

methylcrotonoyl-CoA carboxylase - metilcrotonoíl-CoA-carboxilasa

methylcysteine synthase - cistationina-b-sintasa

methylene blue - cloruro de metiltioninio

methylene blue stain - tinción con cloruro de metiltioninio

methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+) - metilenotetrahidrofolato-deshidrogenasa (NADP+)

5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (FADH2) - 5,10-metilenotetra- hidrofolato-reductasa (FADH2)

methylergonovine - metilergometrina

methylglutaconyl-CoA hydratase - metilglutaconil-CoA-hidratasa

methylglyoxalase - lactoílglutación-liasa



methylketone - metilcetona

methylmalonyl-CoA epimerase - metilmalonil-CoA-epimerasa

methylmalonyl-CoA mutase - metilmalonil-CoA-mutasa

methylmalonyl-CoA racemase - metilmalonil-CoA-epimerasa

3-methyl-2-oxobutanoate dehydrogenase (lipoamide) - 3-metil-2-oxobutanoato-deshidrogenasa (lipoamida)

5-methyltetrahydrofolatehomocysteine S-methyltransferase - 5-metiltetrahidrofolatohomocisteína-S-metiltransferasa

meticillin - meticilina

metmyoglobin - metamioglobina

metrological sensitivity - sensibilidad metrológica

metrological specificity - especificidad metrológica

metrological variability - variabilidad metrológica

metrology - metrología

metronidazole - metronidazol

metirapone - metirapona

mezlocillin - mezlocilina

MFR - melanoliberina

MHC - complejo principal de histocompatibilidad

Michaelis constant - constante de Michaelis

miconazole - miconazol

microagglutination test - prueba de la microaglutinación

microalbuminuria - [con el significado de] **1.** concentración de albúmina en orina
2. excreción de albúmina en orina



microbial collagenase - colagenasa-microbiana

microbiology - microbiología

b2-microglobulin - b2-microglobulina

micrometer - micrómetro

micronuclei formation test - prueba de formación de micronúcleos

micropipette - micropipeta

micropipette with positive displacement - micropipeta de desplazamiento positivo

microscope - microscopio

microscopy - microscopía

microsequencing - microsecuenciación

microsomal aminopeptidase - alanil-aminopeptidasa de membrana

microtiter plate - placa de microvaloración

microtiter well - pocillo de microvaloración

midstream urine - orina del chorro medio

MIF - melanostatina

milk - leche

minimum lethal concentration - concentración letal mínima

minocycline - minociclina

minute chromosome - minicromosoma

misdivision - maldivisión

mismatch - malapareamiento

mismatch repair - reparación de un malapareamiento

missense mutation - mutación sustitutiva



mite - ácaro

mitochondiral deoxyribonucleic acid - ácido desoxirribonucleico mitocondrial

mitochondiral ribonucleic acid - ácido ribonucleico mitocondrial

M C test - prueba del cultivo linfocítico mixto

mobile phase - fase móvil

modifier - modificador

Moeller's bacillus - Mycobacterium phlei

molal - molal

molality - molalidad

molar - molar

molar absorption coefficient - coeficiente de absorción molar

molar absorptivity - absortividad molar

molar concentration: concentración molar

molar conductivity - conductividad molar

molar decadic absorptivity - absortividad decimal molar

molar heat capacity - capacidad térmica molar

molar linear decadic absorption coefficient - coeficiente de absorción decimal lineal molar

molar mass - masa molar

molar volume - volumen molar

molarity - concentración de sustancia

mole - mol

mole fraction - fracción de sustancia



molecular absorption spectrometry - espectrometría de absorción molecular

molecular biology - biología molecular

molecular dispersion spectrometry - espectrometría de dispersión molecular

molecular fluorescence spectrometry - espectrometría de fluorescencia molecular

molecular genetics - genética molecular

molecular hybridization - hibridación molecular

molecular luminiscence spectrometry - espectrometría de luminiscencia molecular

molecular mass - masa molecular

molecular pathology - patología molecular

molecular weight - peso molecular

moment of inertia - momento de inercia

monitoring - monitoreo

monoamine oxidase - amina-oxidasa (flavinífera)

monoblast - monoblasto

monobutyrase - carboxilesterasa

monoclonal antibody - anticuerpo monoclonal

monocromator - monocromador

monocyte - monocito

monophenol monooxygenase: monofenol-monoxigenasa

monophenol oxidase - monofenol-monoxigenasa

monophosphatidylinositol phosphodiesterase - 1-fosfatidilinositol-fosfodiesterasa

Morax-Axenfeld's bacillus - Moraxella lacunata

morbid entity - entidad morbosa



Morgan's bacillus - *Morganella morganii*

motility - motilidad

motility medium - medio para motilidad

moxalactam - latamoxef

MSH - melanotropina

MSU - orina del chorro medio

mucin - mucina

mucinase -1. hialuronato-liasa 2. hialuronoglucosaminidasa 3. hialuronoglucoronidasa

Mueller-Hinton medium - medio de Mueller-Hinton

multicopy plasmid - plásmido multicopia

multiparametric analyzer - multianalizador

multiple crossing - cruzamiento múltiple

multiple drug abuse - politoxicomanía

multiple-well plate - placa de pocillos múltiples

multiplex polymerase chain reaction: reacción en cadena por la polimerasa múltiplex

multisite mutation - mutación multicéntrica

mumps virus - virus de la parotiditis; virus de las paperas

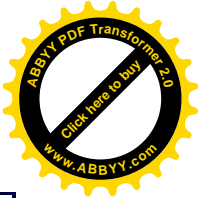
mung bean nuclease - nucleasa S1 de *Aspergillus*

mupirocin - mupirocina

muramidase - lisozima

muscle - músculo

muscle phosphorylase a and b - glucógeno-fosforilasa



MUTAGENIC - mutágeno

mutagenic repair - reparación mutágena

MUTAGENICITY TEST - prueba de mutagenicidad

mutarotase - aldosa-1-epimerasa

mutation - mutación

mutation rate - frecuencia de mutación

mutation site - centro de mutación

muton - mutón

mycetoma - micetoma

mycolysin - micolisina

myelin basic protein - proteína básica de la mielina

myeloblast - mieloblasto

myelocyte - mielocito

myoadenylate deaminase - AMP-desaminasa

myoglobin - mioglobina

myokinase - adenilato-cinasa

myophosphorylase - fosforilasa

myrosinase - tioglucosidasa

N

N. crassa nuclease - nucleasa S1 de *Aspergillus*

NADH-cytochrome b5 reductase - citocromo-b5-reductasa

NADH-dependent methaemoglobin reductase - citocromo-b5-reductasa



NADH peroxidase - NADH-peroxidasa

NAD(P)H dehydrogenase (FMN) - NAD(P)H-deshidrogenasa (FMN)

NADPH:D4-3-ketosteroid-5a-oxidoreductase - 3-oxo-5a-esteroide-4-deshidrogenasa

NAD+ pyrophosphorylase - nicotinamida-nucleótido-adenililtransferasa

nafcillin - nafcilina

NAG - N-acetil-b-glucosaminidasa

nail - uña

Na+/K+-exchanging ATPase - ATPasa intercambiadora de Na⁺ y K⁺

nalidixic acid - ácido nalidíxico

nasal mucus - muco nasal

nasal secretion - secreción nasal

natremia - **1.** concentración de ion sodio en plasma **2.** concentración de ion sodio en suero

natriuria - **1.** concentración de ion sodio en orina **2.** excreción de ion sodio en orina

near care point testing - determinaciones junto a la cabecera del paciente

necrosis - necrosis

negative predictive value - valor predictivo de un resultado negativo

negligible - insignificante; despreciable

neomycin - neomicina

nephelometric immunoassay - inmunoanálisis nefelométrico

nephelometry - nefelometría

Nernst equation - ecuación de Nernst

netilmicin - netilmicina

Neumann's bacillus - Klebsiella pneumoniae



neuraminidase - exo-a-sialidasa

neurotransmitter - neurotransmisor

neutral 17-b-hydroxysteroid oxidoreductase - testosterona-17b-deshidrogenasa (NADP+)

neutral protease : aeromonolisina

neutral sphingomyelinase : esfingomielina-fosfodiesterasa

neutralization test: prueba de la neutralización

neutrophil: neutrofilocito; neutrófilo

neutrophil elastase - elastasa leucocitaria

neutrophilocyte - neutrofilocito; neutrófilo

Newcastle disease virus - virus de la enfermedad de Newcastle

newton - newton

niacin - ácido nicotínico

niacinamide - nicotinamida

nick - mella

nick translation - traslación de mellas

nicking-closing enzyme - DNA-topoisomerasa

Nicolaier's bacillus - Clostridium tetani

nicotinamide - nicotinamida

nicotinamide-adenine dinucleotide - dinucleótido de nicotinamida y adenina

nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate - dinucleótido fosfato de nicotinamida y adenina

nicotinamide mononucleotide - mononucleótido de nicotinamida

nicotinamide-nucleotide adenyltransferase - nicotinamida-nucleótido- adenililtransferasa



nicoumalone - acenocumarol

nitrate assimilation medium - medio de asimilación de nitrato

nitrate reduction medium - medio de reducción de nitrato

nitrate reductase - nitrato-reductasa [NAD(P)H]

nitrate reductase [NAD(P)H] - nitrato-reductasa [NAD(P)H]

nitrocellulose filter - filtro de nitrocelulosa

nitrofurantoin - nitrofurantoína

nitroprusiate - nitrosilpentacianoferrato (III)

Nocard's bacillus - Salmonella typhimurium

noise - ruido

nominal scale - escala nominal

non-coding strand - cadena intrascrita

non-competitive immunoassay - inmunoanálisis no competitivo

non-competitive inhibition - inhibición no competitiva

non-esterified phosphate - fosfato no esterificado

noncompliance - incumplimiento (terapéutico)

nonfermenter - no fermentador

nonnutrient agar plate - placa con agar sin nutrientes

non-repetitive DNA - DNA no repetido

non-selective enrichment medium - medio de enriquecimiento no selectivo

non-selective isolation medium - medio de aislamiento no selectivo

nonsense mutation - mutación sin sentido



non-specific cholinesterase - colinesterasa

nonsporeforming bacillus - bacilo no esporulado

noradrenaline - noradrenalina

noradrenalin - [cuando en realidad hace referencia a noradrenalina más ion noradrenalinio]
noradrenalinio

noradrenalinium - [noradrenalina más ion noradrenalinio] noradrenalinio

norepinephrine - [sustancia endógena] 1. noradrenalina. 2. noradrenalinio

norepinephrine - norepinefrina

norfloxacin - norfloxacina

normal values - valores de referencia (de la población sana)

northern blot - transferencia northern

nortriptyline - nortriptilina

nosocomial - nosocomial; hospitalario

nosographic sensitivity - sensibilidad nosográfica

nosographic specificity - especificidad nosográfica

nosologic sensitivity - sensibilidad nosológica

nosologic specificity - especificidad nosológica

nosology - nosología

novobiocin - novobiocina

nuclear deoxyribonucleic acid - ácido desoxirribonucleico nuclear

nuclear ribonucleic acid - ácido ribonucleico nuclear

nuclease P1 - nucleasa S1 de *Aspergillus*

nuclease S1 - nucleasa S1 de *Aspergillus*



nucleic acid - ácido nucleico

nucleoside - nucleósido

nucleoside-diphosphate kinase - nucleósido-difosfato-cinasa

nucleoside-monophosphate kinase : nucleósido-fosfato-cinasa

nucleoside-phosphate kinase: nucleósido-fosfato-cinasa

nucleoside phosphorylase : purina-nucleósido-fosforilasa

5'-nucleotidase: 5'-nucleotidasa

nucleotide: nucleótido

nuclide: nucleido

null mutation: mutación completa

number concentration: concentración de número

number content: contenido de número

number flow rate: caudal de número

number fraction: fracción de número

number of entities: número de entidades

numerical taxonomy - taxonomía numérica

numerical value - valor numérico

nutrient - **1.** nutriente; nutrimento. **2.** nutritivo

nutrient agar - agar nutritivo

nutrient broth - caldo nutritivo

O

obligate anaerobe - anaerobio obligado



occult blood in faeces - hemoglobina en heces

ochre mutation - mutación ocre

OCT - ornitina-carbamoiltransferasa

ocular micrometer - micrómetro ocular

oestradiol-17b - estradiol-17b

oestradiol 17b-dehydrogenase - estradiol-17b-deshidrogenasa

ofloxacin - ofloxacina

ohm - ohm

oil-immersion lens - objetivo de inmersión en aceite

oleandomycin - oleandomicina

oligocopy number plasmid - plásmido con pocas copias

oligo-1,6-glucosidase - oligo-1,6-glucosidasa

oligoglucan-branching glycosyltransferase - 1,4-a-glucano-6-a-glucosiltransferasa

oligonucleotide fingerprint - huella oligonucleotídica

oligoprobe - oligosonda

N-oligosaccharide glycopeptidase - péptido-N 4-(N-acetil-b-glucosaminil)-asparragina-amidasa

OMP decarboxylase - orotidina-5'-fosfato-descarboxilasa

oncofetal antigen - antígeno oncofetal

oncogen - oncogén

oncovirus - oncovirus

opale mutation - mutación ópalo

open circle DNA - DNA circular abierto



open reading frame - marco de lectura abierto

operating characteristic curve - [en estadística] curva de eficacia

operator - operador

operon - operón

ophio-amino-acid oxidase - -aminoácido-oxidasa

OPRT decarboxylase - orotato-fosforribosiltransferasa

opsonization - opsonización

optical density - absorbancia

optochin test - prueba de la optoquina

ordinal scale - escala ordinal

organism - [en microbiología] microorganismo

ornithine - ornitina

ornithine-d-aminotransferase - ornitinaoxoácido-transaminasa

ornithine carbamoyltransferase - ornitina-carbamoiltransferasa

ornithine carbamyl transferase - ornitina-carbamoiltransferasa

ornithine decarboxylase - ornitina-descarboxilasa

ornithine decarboxylase test - prueba de la ornitina-descarboxilasa

ornithine ketoacid transaminase - ornitinaoxoácido-transaminasa

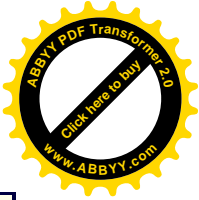
ornithineoxo-acid transaminase - ornitinaoxoácido-transaminasa

ornithine transcarbamylase - ornitina-carbamoiltransferasa

orotate phosphoribosyltransferase - orotato-fosforribosiltransferasa

orotidine-5'-phosphate decarboxylase - orotidina-5'-fosfato-descarboxilasa

orotidine-5'-phosphate pyrophosphorylase - orotato-fosforribosiltransferasa



orotidylic acid phosphorylase - orotato-fosforribosiltransferasa

orotidylic decarboxylase - orotidina-5'-fosfato-descarboxilasa

orotidylic pyrophosphorylase - orotato-fosforribosiltransferasa

orphon - orfón

orthogonal pulse field agarose gel electrophoresis - electroforesis de campo ortogonal pulsante en gel de agarosa

osmolality - osmolalidad

osmometry - osmometría

osmotic coefficient - coeficiente osmótico

osmotic concentration - concentración osmótica

osmotic pressure - presión osmótica

osteocalcin - osteocalcina

otic exudate - exudado ótico

outlier value - valor aberrante

outpatient - paciente ambulatorio

output rate - rendimiento

ovary - ovario

overhanging end - extremo saliente

overlap hybridisation - hibridación por superposición

overlapping end - extremo superpuesto

overlapping sequence - secuencia superpuesta

overnight: durante la noche

oxacillin - oxacilina



oxalate - [ácido oxálico más ion oxalato] oxalato

oxalate decarboxylase - oxalato-descarboxilasa

oxalate oxidase - oxalato-oxidasa

oxalic acid - ácido oxálico

oxalic acid - [cuando en realidad hace referencia a ácido oxálico más ion OXA ATO]
oxalato

oxaloacetate transacetase - citrato-(si)-sintasa

oxalosuccinate decarboxylase - isocitrato-deshidrogenasa (NADP+)

oxidase test - prueba de la oxidasa

oxidation-fermentation test medium - medio para la prueba de oxidación- fermentación

3-oxoacid CoA-transferase - 3-oxoácido-CoA-transferasa

oxoisomerase - glucosa-6-fosfato-isomerasa

oxolinic acid - ácido oxolínico

5-oxoprolinase (ATP-hydrolysing) - 5-oxoprolinasa (hidrolizante de ATP)

5-oxopropyl-peptidase - piroglutamil-peptidasa I

3-oxo-5a-steroid 4-dehydrogenase - 3-oxo-5a-esteroide-4-deshidrogenasa

oxygen - oxígeno

oxygen saturation - saturación de oxígeno

oxyhaemoglobin - oxihemoglobina

oxymyoglobin - oximioglobina

oxytetracycline - oxitetraciclina

P



pachytene - paquítena

packaging - empaquetamiento

packed column - columna preparada

PAGE - electroforesis en gel de poliacrilamida

palindrome - palíndromo

palmitoyl-CoA synthase - ácido-graso-de-cadena-largaCoA-ligasa

pancreas - páncreas

pancreatic carboxypeptidase A - carboxipeptidasa A

pancreatic carboxypeptidase B - carboxipeptidasa B

pancreatic DNase - desoxirribonucleasa I

pancreatic DNase II - desoxirribonucleasa II

pancreatic elastase - elastasa pancreática

pancreatic elastase I - elastasa pancreática

pancreatic kallikrein - calicreína hística

pancreatic ribonuclease - ribonucleasa pancreática

pancreatic RNase - ribonucleasa pancreática

pancreatopeptidase E - elastasa pancreática

pancreozymin - pancrozimina

PAP - fosfatasa ácida prostática

papain - papaína

Papanicolaou stain - tinción de Papanicolaou

papaya peptidase I - papaína

papillomavirus - papilomavirus



paracentesis - paracentesis

parallelism - paralelismo

parasite - parásito

parasitology - parasitología

parathormone - paratirina

parathyrin - paratirina

parathyroid - paratiroides

parathyroid hormone - paratirina

parenteral nutrition - nutrición parenteral

paronychia - paroniquia

partial pressure - presión parcial

partially completed medium - medio semipreparado

b-particle - partícula b

particle counter - contador de partículas

particle counting immunoassay - inmunoanálisis particulométrico

particular property - propiedad particular

particular quantity - magnitud particular

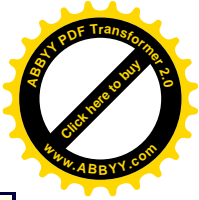
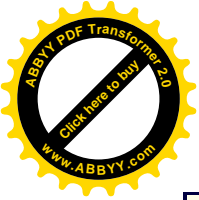
partition coefficient - coeficiente de reparto

pascal - pascal

passive hemagglutination test - prueba de hemaglutinación pasiva

passive immunodiffusion test - prueba de inmunodifusión pasiva

patch repair - reparación por escisión



pathlength - paso de luz

pathobiochemistry - bioquímica clínica

pathogen - patógeno

pathologic entity - entidad patológica

pathologist - anatomopatólogo

pathology - 1. patología. 2. anatomía patológica

pathophysiology - fisiopatología

patient - paciente

P5C dehydrogenase - pirrolín-5-carboxilato-reductasa

PCR - reacción en cadena por la polimerasa

peak - concentración máxima

peak level - concentración máxima

pedigree - árbol genealógico

peer group - grupo de comparación; grupo comparable

peer review - [de un artículo científico] revisión por expertos

pefloxacin - pefloxacina

pellet - sedimento

penetrancy - penetrancia

penicillin G - bencilpenicilina

penicillin V - fenoximetilpenicilina

penicillinase - b-lactamasa

Penicillium citrinum nuclease P1 - nucleasa S1 de *Aspergillus*

pentagastrin - pentagastrina



pentose - pentosa

pepsin - pepsina A

pepsin A - pepsina A

pepsin C - gastricsina

g-peptidase - X-Pro-dipeptidasa

peptidase D - X-Pro-dipeptidasa

peptidase E - alanil-aminopeptidasa de membrana

peptidase P - peptidil-dipeptidasa A

peptidase S - leucil-aminopeptidasa

peptide - péptido

peptide-N4-(N-acetyl-b-glucosaminyl)asparagine amidase - péptido-N4-(N-acetil-b-glucosaminil) asparra-gina-amidasa

peptidyl-Asp metalloendopeptidase - peptidil-Asp-metaloendopeptidasa

peptidyl-dipeptidase A - peptidil-dipeptidasa A

peptidyl dipeptidase I - peptidil-dipeptidasa A

peptone broth - caldo peptonado

percolation - percolación

performance - **1.** prestación **2.** funcionamiento

performance characteristic - característica de funcionamiento

performance standard - norma de funcionamiento

performance status - estado general

perfusion - perfusión

pericardial effusion - derrame pericárdico



pericardial fluid - líquido pericárdico

period - periodo

peritoneal fluid - líquido peritoneal

peroxidase - peroxidasa

peroxidase test - prueba de la peroxidasa

Pfeiffer's bacillus - Haemophilus influenzae

pH - pH

pH-meter - peachímetro

pH-metry - peachimetría

phage - fago

phage typing - tipificación con fagos

pharmaceutical form - forma farmacéutica

pharmacokinetics - farmacocinética

pharyngeal exudate - exudado faríngeo

phase-contrast microscopy - microscopía de contraste de fases

phaseolin - carboxipeptidasa de tipo serina

phasmid - fásmido

phenobarbital - fenobarbital

phenobarbitone - fenobarbital

phenolase - monofenol-monoxigenasa

phenol sulfotransferase - aril-sulfotransferasa

phenotype - fenotipo



phenylalaninase - fenilalanina-4-monoxigenasa

phenylalanine - fenilalanina

phenylalanine 4-hydroxylase - fenilalanina-4-monoxigenasa

phenylalanine 4-monooxygenase - fenilalanina-4-monoxigenasa

phenylethanolamine N-methyltransferase - feniletanolamina-N-metiltransferasa

phenylpyruvic acid - ácido fenilpirúvico

phenytoin - fenitoína

pheromone - feromona

phosphate - [con el significado de] fosfato no esterificado

phosphate - [ácido fosfórico más ion fosfato] fosfato

phosphate acetyltransferase - fosfato-acetiltransferasa

phosphate buffer - tampón de fosfato

phosphatemia - **1.** concentración de fosfato no esterificado en plasma
2. concentración de fosfato no esterificado en suero

phosphatidase - fosfolipasa A2

phosphatidolipase - fosfolipasa A2

3-sn-phosphatidylcholine - 3-sn-fosfatidilcolina

phosphatidylcholinesterol O-acyltransferase- fosfatidilcolinaesteroI-O- aciltransferasa

1-phosphatidylinositol phosphodiesterase- 1-fosfatidilinositol-fosfodiesterasa

phosphatidylinositol phospholipase C -1-fosfatidilinositol-fosfodiesterasa

phosphaturia - **1.** concentración de fosfato no esterificado en orina **2.** excreción de fosfato no esterificado en orina

phosphoacylase - fosfato-acetiltransferasa

phosphodiesterase - nucleótido 3'-5'-cíclico-fosfodiesterasa



phosphodiesterase I - fosfodiesterasa I

phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) - fosfoenolpiruvato-carboxicina (GTP)

phosphoenolpyruvate carboxylase - fosfoenolpiruvato-carboxilasa

phosphoenolpyruvate carboxylase - fosfoenolpiruvato-carboxicina (GTP)

phosphoenolpyruvate kinase - piruvato-cinasa

phosphoenol transphosphorylase - piruvato-cinasa

6-phosphofructokinase - 6-fosfofructocinasa

phosphofructokinase I - 6-fosfofructocinasa

phosphoglucosomerase - glucosa-6-fosfato-isomerasa

phosphoglucomutase - fosfoglucomutasa

phosphoglucomutase - fosfoglicerato-mutasa

6-phosphogluconate dehydrogenase - fosfogluconato-deshidrogenasa (descarboxilante)

phosphogluconate dehydrogenase (decarboxylating) - fosfogluconato- deshidrogenasa (descarboxilante)

phosphogluconic acid dehydrogenase - fosfogluconato-deshidrogenasa (descarboxilante)

6-phosphogluconic carboxylase - fosfogluconato-deshidrogenasa (descarboxilante)

6-phosphogluconic dehydrogenase - fosfogluconato-deshidrogenasa (descarboxilante)

6-phosphogluconolactonase - 6-fosfogluconolactonasa

phosphoglucose isomerase - glucosa-6-fosfato-isomerasa

2-phosphoglycerate dehydratase - fosfopiruvato-hidratasa

phosphoglycerate kinase - fosfoglicerato-cinasa

3-phosphoglycerate kinase - fosfoglicerato-cinasa

phosphoglycerate mutase - fosfoglicerato-mutasa



phosphoglycerate phosphomutase - fosfoglicerato-mutasa

phosphoglycerokinase - fosfoglicerato-cinasa

phosphoglyceromutase - fosfoglicerato-mutasa

phosphohexoisomerase - 1. glucosa-6-fosfato-isomerasa 2. manosa-6-fosfato- isomerasa

phosphohexokinase - 6-fosfofructocinasa

phosphohexomutase - 1. glucosa-6-fosfato-isomerasa 2. manosa-6-fosfato- isomerasa

phosphohexose isomerase - glucosa-6-fosfato-isomerasa

phospholipase A2 - fosfolipasa A2

phospholipase C - fosfolipasa C

phospholipase D - fosfolipasa D

phospholipid - fosfolípido

phospholipidcholesterol acyltransferase - fosfatidilcolinaesterol-O-aciltransferasa

phosphomannose isomerase - manosa-6-fosfato-isomerasa

phosphomonoesterase - 1. fosfatasa ácida 2. fosfatasa alcalina

phosphopentoisomerase - ribosa-5-fosfato-isomerasa

phosphopyruvate carboxylase - fosfoenolpiruvato-carboxicinas (GTP)

phosphopyruvate hydratase - fosfopiruvato-hidratasa

phosphoriboisomerase - ribosa-5-fosfato-isomerasa

phosphoribosyldiphosphate 5-amidotransferase - amidofosforribosiltransferasa

phosphoribosyl pyrophosphate synthetase - ribosa-fosfato-pirofosfocinasa

5-phosphoribosyl 1-pyrophosphate synthetase - ribosa-fosfato-pirofosfocinasa

phosphoric acid - ácido fosfórico



phosphoric acid - [cuando en realidad hace referencia a ácido fosfórico más ion fosfato]
fosfato

phosphorus - fósforo

phosphorus - [con el significado de] fosfato no esterificado

phosphorylase - fosforilasa

phosphorylase kinase - fosforilasa-cinasa

phosphosaccharomutase - glucosa-6-fosfato-isomerasa

phosphotransacetylase - fosfato-acetiltransferasa

phosphotriose isomerase - triosa-fosfato-isomerasa

photinus-luciferin 4-monooxygenase (ATP-hydrolysing) - photinus-luciferina-4-monoxigenasa (hidrolizante de ATP)

photocell - fotocélula

photometer - [con el significado de] espectrómetro

photometry - [con el significado de] espectrometría

photomultiplier - fotomultiplicador

physiological variation - variación fisiológica

physiology - fisiología

physiopathology: fisiopatología

PIF : prolactostatina

pill: píldora

pinworm: 1. Enterobius vermicularis 2. oxiuro

piperacillin: piperacilina

pipet - pipeta

pipette - pipeta



pituitary - 1. hipófisis 2. hipofisario -ia

pituitary gland - hipófisis

pivampicillin - pivampicilina

planar chromatography - cromatografía planar

planning - planificación; planeamiento; proyecto

plasma - plasma

plasma cell - plasmocito

plasma kallikrein - calicreína plasmática

plasma level - concentración plasmática

plasma renin activity - 1. concentración de masa de renina en plasma.
2. concentración catalítica de renina en plasma

plasma thromboplastic antecedent - factor XI de la coagulación

plasma thromboplastic cofactor - factor IX de la coagulación

plasmablast - plasmoblasto

plasmacyte- plasmocito

plasmalogen synthase- plasmalógeno-sintasa

plasmid - plásmido

plasmid-mediated antibiotic resistance - resistencia a los antibióticos mediada por plásmidos

plasmin - fibrinolisisina

t-plasminogen activator - activador del t-plasminógeno

u-plasminogen activator - activador del u-plasminógeno

platinum calomel electrode - electrodo de calomelano de platino

plattelet - trombocito; plaqueta



pleomorphic - pleomórfico

pleural aspiration - punción pleural

pleural effusion - derrame pleural

pleural fluid - líquido pleural

point mutation - mutación puntual

polarizing microscope - microscopio de polarización

polarography - polarografía

poly A - poli A

poly A tail - extremo de poli A

1,4-b-poly-N-acetylglucosaminidase - quitinasa

polyacrylamide gel - gel de poliacrilamida

polyacrylamide gel electrophoresis - electroforesis en gel de poliacrilamida

polydeoxyribonucleotide synthase (ATP) - DNA-ligasa (ATP)

polydeoxyribonucleotide synthase (NAD⁺) - DNA-ligasa (NAD⁺)

poly-b-glucosaminidase - quitinasa

polylinker - poliligador

polymerase chain reaction - reacción en cadena por la polimerasa

polymorphism information content - contenido informativo del polimorfismo

polymorphism rate - frecuencia de polimorfismo

polymorphonuclear neutrophil - neutrofilocito segmentado; neutrófilo segmentado

polymorphonuclear neutrophilocyte - neutrofilocito segmentado; neutrófilo segmentado

polymyxin - polimixina B



polymyxin B - polimixina B

polynucleotide 5'-hydroxyl-kinase - polinucleótido-5'-hidroxil-cinasa

polynucleotide kinase - polinucleótido-5'-hidroxil-cinasa

polynucleotide ligase - DNA-ligasa (ATP)

polynucleotide ligase (NAD⁺) - DNA-ligasa (NAD⁺)

polynucleotide phosphorylase - polirribonucleótido-nucleotidiltransferasa

polyol dehydrogenase - -iditol-deshidrogenasa

polyphosphorylase - glucógeno-fosforilasa

polyribonucleotide nucleotidyltransferase - polirribonucleótido- nucleotidiltransferasa

poly(α -2,8-sialoside) α -2,8-sialosylhydrolase - endo- α -sialidasa

poly(α -2,8-sialosyl) endo-N-acetylneuraminidase - endo- α -sialidasa

polytene chromosome - cromosoma politénico

polyvinyl alcohol - alcohol polivinílico

pool - mezcla

pork tapeworm - 1. *Taenia solium* 2. *tenia*

porphobilinogen deaminase - hidroximetilbilano-sintasa

porphobilinogen synthase - porfobilinógeno-sintasa

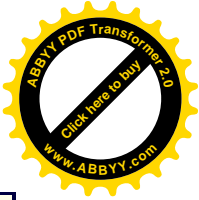
porphyrin - porfirina

positional cloning - clonación posicional

positive predictive value - valor predictivo de un resultado positivo

postreplicative recombination repair - reparación por recombinación posreplicativa

potassemia - 1. concentración de ion potasio en plasma 2. concentración de ion potasio en suero



potassium - potasio

potassium - [con el significado de] ion potasio

potassium ion - ion potasio

potential - potencial

potential difference - diferencia de potencial

potentiometry - potenciometría

power - potencia

PP-ribose-P synthetase - ribosa-fosfato-pirofosfocinasa

P-protein - glicina-deshidrogenasa (descarboxilante)

practicability - practicabilidad

prealbumin - transtiretina

precipitation test - prueba de la precipitación

precipitin - precipitina

precipitin line - línea de precipitación

precision - precisión

predictive value of a negative result - valor predictivo de un resultado negativo

predictive value of a positive result - valor predictivo de un resultado positivo

pregnancy test - prueba de embarazo

Preisz-Nocard's bacillus - *Corynebacterium pseudotuberculosis*

prekallikrein - precalicreína

premessage RNA: RNA premensajero

premetrological variation - variación premetrológica

preservation medium - medio conservante



PRESERVATIVE - conservante

pressure - presión

pressure flow - flujo por presión

pre-uroporphyrinogen synthase - hidroximetilbilano-sintasa

prevalence - prevalencia

previtamin D3 - (6Z)-tacalcíol

PRF - prolactoliberina

primary sample - muestra primaria

primary standard - patrón primario

prime plasmid - plásmido primero

primer - cebador

primer extension - prolongación del cebador

primidone - primidona

primosome - primosoma

principle of measurement - principio de medición

prion - prión

PR - prolactina

proangiotensin - proangiotensina

probe - sonda

probit - probit

procaine esterase - carboxilesterasa

procedure - procedimiento



procedures manual - manual de procedimientos

process - proceso

procollagen aminoprotease - procolágeno-N-endorpeptidasa

procollagen N-endorpeptidase - procolágeno-N-endorpeptidasa

procollagen-lysine 5-dioxygenase - procolágeno-lisina-5-dioxygenasa

procollagen peptidase - procolágeno-N-endorpeptidasa

procollagen-proline dioxygenase - procolágeno-prolina-dioxygenasa

procollagen protease - procolágeno-N-endorpeptidasa

procollagen N-proteinase - procolágeno-N-endorpeptidasa

procollagen type III - procolágeno de tipo III

proctase B - aspergiloepsina I

prodrug - profármaco

proenzyme - proenzima; zimógeno

proficiency testing - ensayo de aptitud

progesterone - progesterona

progesterone reductase - 3b-hidroxi-D5-esteroide-deshidrogenasa

prognosis - pronóstico

program - programa

PROGRANU OCYTE - progranulocito

prolactin - prolactina

prolactin release-inhibiting factor - prolactostatina

prolactin-releasing factor - prolactoliberina

prolidase - X-Pro-dipeptidasa



proline - prolina

proline dehydrogenase - prolina-deshidrogenasa

proline dipeptidase - X-Pro-dipeptidasa

proline hydroxylase - procolágeno-prolina-dioxigenasa

proline oxidase - prolina-deshidrogenasa

proline,2-oxoglutarate 4-dioxygenase - procolágeno-prolina-dioxigenasa

prolymphocyte - prolinfocito

promegakaryocyte - promegacariocito

promegaloblast - promegaloblasto

promonocyte - promonocito

promoter - promotor

promoter screening vector - vector de detección de un promotor

pronase - micolisina

pronormoblast - pronormoblasto

proof-reading - corrección de galeras; corrección de pruebas (de imprenta)

property - propiedad

prophage - profago

prophylaxis - profilaxis

propionyl-CoA carboxylase - propionil-CoA-carboxilasa

proplasmacyte - proplasmocito

propranolol - propranolol

prostaglandin-endoperoxide synthase - prostaglandina-endoperóxido-sintasa



prostaglandin G/H synthase - prostaglandina-endoperóxido-sintasa

prostaglandin synthase - prostaglandina-endoperóxido-sintasa

prostate specific antigen - antígeno específico de la próstata

prostatic fluid - líquido prostático

prosthetic group - grupo prostético

protaminase - carboxipeptidasa B

protein - proteína

w-protein - DNA-topoisomerasa

protein binding - unión a proteínas

proteinase B - aspergiloepsina I

proteinase K - endopeptidasa K

proteinemia - **1.** concentración de proteína en plasma **2.** concentración de proteína en suero

protein-glutamine g-glutamyltransferase - proteína-glutamina-g- glutamil- transferasa

proteinuria - [con el significado de] **1.** concentración de proteína en orina
2. excreción de proteína en orina

protein xylosyltransferase - proteína-xilosiltransferasa

prothrombase - factor Xa de la coagulación

prothrombin - protrombina

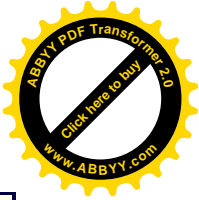
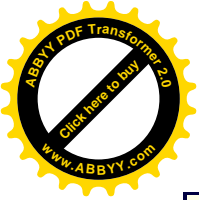
prothrombinase - factor Xa de la coagulación

protirelin - protirelina

procollagen hydroxylase - procolágeno-prolina-dioxigenasa

procollagen lysyl hydroxylase - procolágeno-lisina-5-dioxigenasa

proto-oncogen - protooncogén



protoporphyrin - protoporfirina

protoporphyrinogen oxidase - protoporfirinógeno-oxidasa

prototroph - prototrofo

prozone effect - efecto prozona

PRPP synthetase - ribosa-fosfato-pirofosfocinasa

pseudocast -seudocilindro (urinario)

pseudocholinesterase - colinesterasa

pseudo leucine aminopeptidase - alanil-aminopeptidasa de membrana

PSP - fenolsulfoftaleína

PTH - paratirina

publisher - editor

puff - abultamiento

pullulanase - a-dextrina-endo-1,6-a-glucosidasa

pulse-field electrophoresis - electroforesis en gel con campo pulsátil

purine-nucleoside phosphorylase - purina-nucleósido-fosforilasa

purulent - purulento

pus - pus

PVA - alcohol polivinílico

pyocin - piocina

pyocin typing - piocinotipia

pyogenic - piógeno

pyridoxal - piridoxal

pyridoxine - piridoxina



pyrimidine nucleotidase - 5'-nucleotidasa

pyrimidine-5'-nucleotide nucleosidase - pirimidina-5'-nucleótido-nucleosidasa

pyrimidine-specific 5'-nucleotidase - 5'-nucleotidasa

pyroglutamase (ATP-hydrolysing) - 5-oxoprolinasa (hidrolizante de ATP)

pyroglutamate hydrolase - 5-oxoprolinasa (hidrolizante de ATP)

pyroglutamyl aminopeptidase - piroglutamil-peptidasa I

pyroglutamyl-peptidase I - piroglutamil-peptidasa I

pyrrolidone-carboxylate peptidase - piroglutamil-peptidasa I

1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase - 1-pirrolín-5-carboxilato- deshidrogenasa

D1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase - pirrolín-5-carboxilato-reductasa

pyrroline-5-carboxylate reductase - pirrolín-5-carboxilato-reductasa

pyruvate - [ácido pirúvico más ion piruvato] piruvato

pyruvate carboxylase - piruvato-carboxilasa

pyruvate decarboxylase - piruvato-descarboxilasa

pyruvate decarboxylase - piruvato-deshidrogenasa (lipoamida)

pyruvate dehydrogenase - **1.** piruvato-deshidrogenasa (citocromo) **2.** piruvato-deshidrogenasa (lipoamida)

pyruvate dehydrogenase (cytochrome) - piruvato-deshidrogenasa (citocromo)

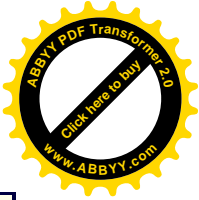
pyruvate dehydrogenase (lipoamide) - piruvato-deshidrogenasa (lipoamida)

pyruvate kinase - piruvato-cinasa

pyruvate oxidase - piruvato-oxidasa

pyruvic acid - ácido pirúvico

pyruvic acid - [cuando en realidad hace referencia a ácido pirúvico más ion piruvato] piruvato



pyruvic carboxylase - piruvato-carboxilasa

pyruvic decarboxylase - piruvato-descarboxilasa

pyruvic dehydrogenase - **1.** piruvato-deshidrogenasa (citocromo) **2.** piruvato- deshidrogenasa (lipoamida)

pyruvic oxidase - piruvato-oxidasa

Q

Q-enzyme - enzima ramificadora del 1,4-a-glucano

qualitative analysis - análisis cualitativo

qualitology - cualitología

qualitometrics - cualitometría

quality - calidad

quality assessment - evaluación de la calidad

quality assurance - garantía de la calidad

quality audit - auditoría de la calidad

quality control - control de la calidad

quality management - gestión de la calidad

quality policy - política de la calidad

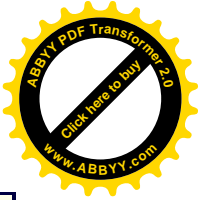
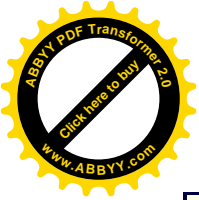
quantitative analysis - análisis cuantitativo

quantity - magnitud

Quellung test - reacción de Quellung

queuine - queuina

quinidine - quinidina



R

rabbit ileal loop test - prueba del asa ileal en conejo

rabies virus - virus de la rabia

rad - rad

radial immunodiffusion - inmunodifusión radial

radial partition fluorimetric enzyme immunoassay - fluoroenzimoinmunoanálisis de partición radial

radiant energy - energía radiante

radiant excitance - excitancia radiante

radiant flux - flujo radiante

radiant intensity - intensidad radiante

radiant power - potencia radiante

radioactive tagging - radiomarcado

radioactivity - radiactividad

radioallergosorbent test - prueba de radioalergosorbencia

radioimmunoassay - radioinmunoanálisis

radioimmunosorbent test - prueba de radioinmunosorbencia

radioisotope - radisótopo; isótopo radiactivo

radionuclide - radionucleido

random access - acceso aleatorio

random access analyzer - analizador de acceso directo

random error - error aleatorio

random priming - cebado aleatorio



randomization - aleatorización; distribución al azar

range - intervalo

ranking - clasificación

rapid identification system - sistema de identificación rápida

RAST - prueba de radioalergosorbencia

rate of conversion - velocidad de transformación

rate of reaction - velocidad de reacción

ratio - razón

ratio scale - escala racional

g-ray - rayo g

RBC - eritrocito

RBC cast - cilindro hemático

reactant - reactante

readability - lectura mínima

reading - lectura

reading frame - marco de lectura

reading frameshift - desplazamiento del marco de lectura

readthrough - translectura

ready-to-use medium - medio preparado

reagent - reactivo

reagent strip - tira reactiva

reagents kit - equipo de reactivos



reagin - reagina

receiver-operating characteristic curve - [en semiología] curva de rendimiento diagnóstico

receptor - receptor

recipient cell - célula receptora

recombinant DNA - DNA recombinante

recombination repair - reparación por recombinación

recombinational hot-spot - punto caliente de recombinación

recombinator - recombinador

recombinogenic element - recombinador

recovery - recuperación

rectilinearity - rectilinealidad

red blood cell - eritrocito

red cell - eritrocito

reference distribution - distribución de referencia

reference electrode - electrodo de referencia

reference individual - individuo de referencia

reference laboratory - laboratorio de referencia

reference limit - límite de referencia

reference material - material de referencia

reference method - método de referencia

reference population - población de referencia

reference procedure - procedimiento de referencia

reference range - intervalo de referencia



reference sample - muestra de referencia

reference value - valor de referencia

reflectance spectrometry - espectrometría de reflectancia

reflection factor - factor de reflexión

refractive index - índice de refracción

refractometry - refractometría

regulator gene - gen regulador

regulon - regulón

relative atomic mass - masa atómica relativa

relative density - densidad relativa

relative error - error relativo

relative inaccuracy - inexactitud relativa

relative molecular mass - masa molecular relativa

relative quantity - magnitud relativa

relaxed circle - DNA circular relajado

relaxing enzyme - DNA-topoisomerasa

release factor - factor de terminación

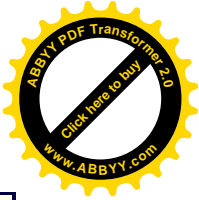
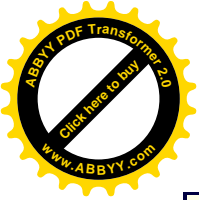
release splicing - eliminación de intrones

reliability - fiabilidad

rem - rem

remove (to) - eliminar; extraer

renal calculus - cálculo renal



renal clearance - depuración renal

renal tubule - túbulo renal

renaturation - renaturalización

renin - renina

repeat - repetición

repeatability - repetibilidad

replacement vector - vector por sustitución

replication - replicación

replication fork - horquilla de replicación

replicon - replicón

replicon fusion - fusión de replicones

report - informe

reporter gene - gen indicador

representational difference analysis - análisis de diferencias representativas

repression - represión

reproducibility - reproducibilidad

reptilase - venombina A

reservoir - depósito

residence time - periodo de permanencia

resistance - resistencia

resistance transfer factor: plásmido de resistencia

resistivity: resistividad

resolution: resolución



respiratory syncytial virus: virus respiratorio sincitial

restricted transduction: transducción restringida

restriction enzyme: enzima de restricción

restriction fragment length polymorphism - polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción

restriction mapping - cartografía de restricción

restriction site - centro de restricción

result - resultado

resuscitation medium - medio de reanimación

reticulocyte - reticulocito

retinal reductase - alcohol-deshidrogenasa [NAD(P)+]

retinene - retinal

retinene1 - retinal

retinol - retinol

retinol-binding protein - proteína enlazante de retinol

retriever vector - vector recuperador

retroposon - retrotransposón

retrotransposon - retrotransposón

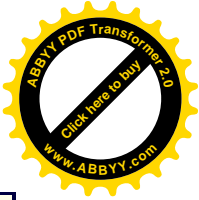
reverse mutation - reversión

reverse transcriptase - DNA-polimerasa dirigida por RNA

reverse transcription - transcripción inversa

reverse triiodothyronin - triiodotironina inversa

reversion - reversión



revertase - DNA-polimerasa dirigida por RNA

RF - factores reumatoideos

Rh factor - factor Rh

rheumatoid factor - factor reumatoideo

RIA - radioinmunoanálisis

riboflavin - riboflavina

ribonuclease I - ribonucleasa pancreática

ribonucleic acid - ácido ribonucleico

ribonucleoprotein - ribonucleoproteína

riboprobe - ribosonda

ribose - ribosa

ribose-5-phosphate isomerase - ribosa-5-fosfato-isomerasa

ribose-phosphate pyrophosphokinase - ribosa-fosfato-pirofosfocinasa

ribosomal ribonucleic acid - ácido ribonucleico ribosómico

ribosomal RNA - RNA ribosómico

ribosome-binding site - centro de unión al ribosoma

ribosylthymine 5'-diphosphate - 5'-difosfato de ribosiltimina

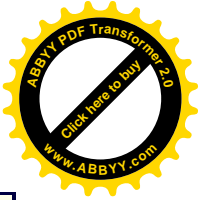
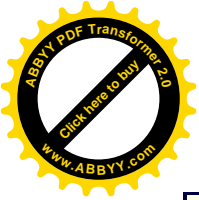
ribosylthymine 5'-phosphate - 5'-fosfato de ribosiltimina

ribosylthymine 5'-triphosphate - 5'-trifosfato de ribosiltimina

ribosylthymine - ribosiltimina

ribozyme - ribozima

rifampicin - rifampicina



rifampin - rifampicina

risk factor - factor de riesgo

RIST - prueba de radioinmunosorbencia

RNA-directed DNA polymerase - DNA-polimerasa dirigida por RNA

RNA nucleotidyltransferase (DNA-directed)- RNA-polimerasa dirigida por DNA

RNA polymerase - RNA-polimerasa dirigida por DNA

RNA polymerase I, II, III - RNA-polimerasa dirigida por DNA

RNA processing - maduración del RNA

RNase - ribonucleasa pancreática

RNase A - ribonucleasa pancreática

RNase I - ribonucleasa pancreática

RNP antigen - antígeno ribonucleoproteico

robotry - automática

robustness - robustez

ROC curve - [en semiología] curva de rendimiento diagnóstico

roentgen - röntgen

rolling circle - círculo rodador

room temperature - temperatura ambiente

rotational frequency - frecuencia rotacional

routine examination - examen sistemático

run - serie

runaway plasmid - plásmido autorreplicable

run off - prueba de transcripción (no iniciada)



run on - prueba de transcripción (iniciada)

S

Sabouraud agar - agar de Sabouraud

saccharase - b-fructofuranosidasa

saccharogen amylase - b-amilasa

saccharopine dehydrogenase - sacaropina-deshidrogenasa (NAD⁺, formadora de -glutamato)

saccharopine dehydrogenase (NAD⁺, -glutamate-forming) - sacaropina- deshidrogenasa (NAD⁺,formadora de-glutamato)

saccharopine dehydrogenase (NAD⁺, -lysine-forming) - sacaropina- deshidrogenasa (NAD⁺, formadora delisina)

Sachs bacillus - Clostridium septicum

safe - inocuo

safety - **1.** seguridad. **2.** inocuidad

safranin - safranina

salicylate - [ácido salicílico más ion salicilato] salicilato

salicylic acid - ácido salicílico

salicylic acid - [cuando en realidad hace referencia a ácido salicílico más ion SA ICI ATO] salicilato

saliva - saliva

salivary - salival

Salmonella-Shigella agar - agar para Salmonella yShigella

salt tolerance test - prueba de tolerancia a la sal

sample - muestra



sampler - muestreador

sampling - muestreo

sandwich immunoassay - inmunoanálisis en sándwich

sarcosine - sarcosina

sarcosine dehydrogenase - sarcosina-deshidrogenasa

sarcosine oxidase - sarcosina-oxidasa

satellitism test - prueba del satelitismo

saturation - saturación

saturation fraction - fracción saturante

scale - escala

scanning electron microscopy - microscopía electrónica de barrido

Schmitz's bacillus - *Shigella dysenteriae* de tipo 2

Schmorl's bacillus - *Fusobacterium necrophorum*

Schottmüller's bacillus - *Salmonella schottmuelleri*

scintillation - centelleo

scintillation counter - contador de centelleo

scintillation detector - detector de centelleo

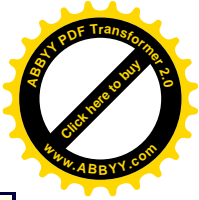
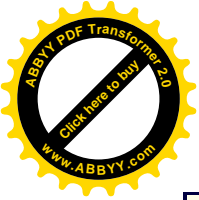
scintillator - contador de centelleo

screening - 1. cribado 2. detección precoz

sealase - DNA-ligasa (ATP)

secondary standard - patrón secundario

secretin - secretina



secretion - secreción

sediment - sedimento

sedimentation - sedimentación

sedimentation coefficient - coeficiente de sedimentación

sedimentation velocity - eritrosedimentación

segmented neutrophil - neutrofilocito segmentado; neutrófilo segmentado

segmented neutrophilocyte - neutrofilocito segmentado; neutrófilo segmentado

selective access - acceso selectivo

selective enrichment medium - medio de enriquecimiento selectivo

selective isolation medium - medio de aislamiento selectivo

selenite broth - caldo con selenita

selenium - selenio

self-cloning - autoclonación

self-replication - autorreplicación

self-splicing - autoeliminación de intrones

semeiologic value - valor semiológico

semeiology - semiología

semen - semen, esperma

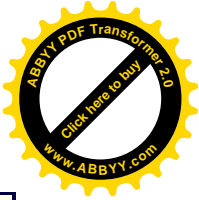
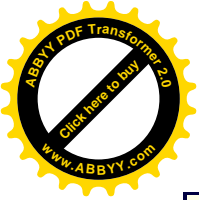
seminal fluid - semen, esperma

seminal plasma - plasma seminal

sense codon: codón traducible

sense strand - cadena homosentido

sensitivity - [con el significado de] 1. límite de detección 2. detectabilidad



sensor - sensor

sepiapterin reductase - sepiapterina-reductasa

sequencing - secuenciación

sequencing primer linker - esplínquer

sequential access - acceso secuencial

sequential immunoassay - inmunoanálisis secuencial

Sereny test - prueba de Sereny

series - serie

serine - serina

serine carboxypeptidase II - carboxipeptidasa de tipo serina

serine sulphydrase - cistationina-b-sintasa

serine-type carboxypeptidase - carboxipeptidasa de tipo serina

sermorelin - sermorelina

serum - suero

serum level - concentración sérica

serum kallikrein - calicreína plasmática

severe - grave

sex hormone-binding globulin - globulina enlazante de las hormonas sexuales

sexually transmitted disease - enfermedad de transmisión sexual

SGOT - aspartato-aminotransferasa

SGPT - alanina-aminotransferasa

Shiga's bacillus - Shigella dysenteriae tipo 1



Shiga-Kruse's bacillus - Shigella dysenteriae tipo 1

shock - choque

shotgun - clonación al azar

shut-down state - estado de desconexión parcial

shuttle vector - vector transportador

sialidase - exo-a-sialidasa

sialyltransferase - N-acetilactosaminida-a-2,3-sialiltransferasa

2,3-sialyltransferase - b-galactósido-a-2,3-sialiltransferasa

2,6-sialyltransferase - b-galactósido-a-2,6-sialiltransferasa

sideremia - **1.** concentración de hierro(II+III) en plasma **2.** concentración de hierro(II+III) en suero

siemens - siemens

sievert - siévert

sign - signo

signal - señal

silencer - lentificador

silent mutation - mutación imperceptible

simple strand DNA - DNA monocatenario

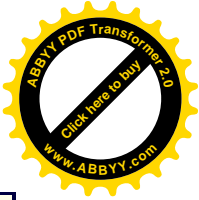
single hit - impacto único

single site mutation - mutación puntual

single strand DNA - DNA monocatenario

single-stranded-nuclease endonuclease - nucleasa S1 de Aspergillus

sinigrase : tioglucosidasa



sinigrinase - tioglucosidasa

sisomicin - sisomicina

site-specific recombination - recombinación específica de una secuencia

sizing column - columna de exclusión molecular

skin - piel

skin fibroblast (cultured) - fibroblasto (cultivado) de la piel

skin fibroblast - fibroblasto de la piel

slant agar culture - cultivo inclinado

slide - 1. portaobjetos. 2. diapositiva

slide agglutination test - prueba de la aglutinación en portaobjetos

slide culture technique - técnica del cultivo en portaobjetos

slot - ranura

slot blot - transferencia en ranura

smear - [en microscopía] extensión

sodium - sodio

sodium - [con el significado de] ion sodio

sodium ion - ion sodio

sodium pump - ATPasa intercambiadora de Na⁺ y K⁺

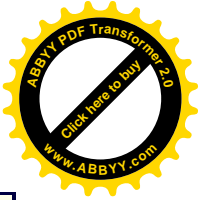
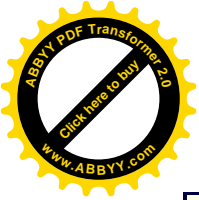
solid culture medium - medio de cultivo sólido

solubility product - producto de solubilidad

solvatation - solvatación

solvent - disolvente; solvente

somatoliberin - somatoliberina



somatomedin - somatomedina

somatorelin - somatorelina

somatostatin - factor de crecimiento insulinoide

somatotropin-releasing factor - somatoliberina

somatropic hormone - somatotropina

somatropin - somatotropina

Sonne's bacillus - Shigella sonnei

Sonne-Duval's bacillus - Shigella sonnei

sorbitol dehydrogenase - -iditol-deshidrogenasa

southern blot - transferencia southern

spacer DNA - DNA espaciador

spacer RNA - RNA espaciador

species - especie

specification: especificación

specific activity: actividad específica

specific conductance: conductancia específica

specific gravity : densidad relativa

specific heat capacity: capacidad térmica específica

specific volume: volumen específico

specificity - especificidad

specimen - espécimen

spectinomycin - espectinomicina



spectral bandwidth - anchura de banda espectral

spectrometer - espectrómetro

spectrometry - espectrometría

spectrophotometer - espectrómetro

spectrophotometry - espectrometría

spectroscopy - espectroscopía

specular reflectance - reflectancia especular

speed - velocidad

sperm - esperma; semen

spermatozoid - espermatozoide

sphingomyelin - esfingomielina

sphingomyelin phosphodiesterase - esfingomielina-fosfodiesterasa

spinal fluid - líquido cefalorraquídeo

spindle - huso

spiramycin - espiramicina

spleen - bazo

spleen exonuclease - exonucleasa esplénica

spleen phosphodiesterase - exonucleasa esplénica

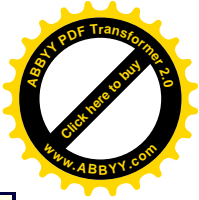
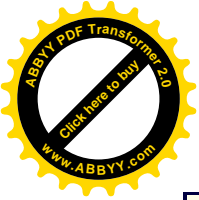
spliceosome - espliceosoma

splicing - eliminación de intrones

splicing site - zona de unión exón-intrón

splinker - esplínquer

split gene - gen discontinuo



spore - espora

sporicide - esporicida

sporozoite - esporozoito

spray - aerosol; pulverizador

spreading factor - **1.** hialuronato-liasa **2.** hialuronoglucosaminidasa
3. hialuronoglucoronidasa

sputum - esputo

SRF - somatoliberina

ssDNA - DNA monocatenario

SS agar - agar SS

stab culture - cultivo por picadura

stability - estabilidad

staff - plantilla; personal

staggered cut - corte en bisel

stain - tinción

standard - **1.** patrón **2.** norma **3.** estándar

standard deviation - desviación típica

stand - puesto

stand-by state - estado de reposo

starch hydrolysis test - prueba de la hidrólisis del almidón

start-up time - periodo de arranque

stat - determinación urgente

state of the art - [de algún objeto o actividad] **1.** estado actual **2.** panorama actual



stationary phase - fase estacionaria

statistic - estadístico

statistics - estadística

STD - enfermedad de transmisión sexual

steady state - 1. estado estacionario. 2. equilibrio dinámico

steam sterilization - esterilización por vapor

Steers replicator - replicador de Steers

stem bromelain - bromelaína de tronco

stem cell - hemocitoblasto

sterile - estéril

sterilization - esterilización

steroid cytochrome P45021-hydroxylase - esteroide-21-monoxigenasa

steroid 17,20-desmolase - 17a-hidroxiprogesterona-aldolasa

steroid 20,22-desmolase - colesterol-monoxigenasa (escisora de la cadena lateral)

steroid 18-hydroxylase - corticosterona-18-monoxigenasa

steroid 21-hydroxylase - esteroide-21-monoxigenasa

steroid 17a-hydroxylase - esteroide-17a-monoxigenasa

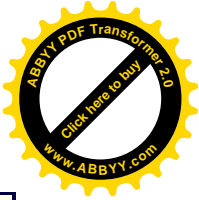
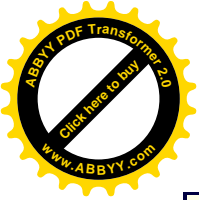
steroid 11b-hydroxylase - esteroide-11b-monoxigenasa

steroid 11b/18-hydroxylase - esteroide-11b-monoxigenasa

steroid D-isomerase - esteroide-D-isomerasa

steroid 17,20-lyase - 17a-hidroxiprogesterona-aldolasa

steroid 20,22-lyase - colesterol-monoxigenasa (escisora de la cadena lateral)



steroid 21-monooxygenase - esteroide-21-monoxigenasa

steroid 17a-monooxygenase - esteroide-17a-monoxigenasa

steroid 11b-monooxygenase - esteroide-11b-monoxigenasa

steroid 5a-reductase - 3-oxo-5a-esteroide-4-deshidrogenasa

steroid sulfatase - esteril-sulfatasa

sterol O-acyltransferase - esterol-O-aciltransferasa

sterol esterase - esterol-esterasa

sterol-ester synthase - esterol-O-aciltransferasa

steryl-sulfatase - esteril-sulfatasa

STH - somatotropina

sticky end - extremo cohesivo

stimulon - estímulo

stock - 1. existencias 2. reserva

stoichiometric number - número estequiométrico

stomach - estómago

stool - heces

stool culture - coprocultivo

stop codon - codón finalizador

storage - almacenamiento

strain - cepa

strand - cadena

stratification - estratificación

Streptomyces griseus neutral proteinase - micolisina



stress - estrés

stringency - rigor

strobila - estrobilo

Strong's bacillus - *Shigella flexneri*

Stuart factor - factor X de la coagulación

Stuart transport medium - medio de transporte de Stuart

submandibular kallikrein - calicreína hística

submaxillary kallikrein - calicreína hística

subspecies - subespecie

substance - sustancia

substance concentration - concentración de sustancia

substance content - contenido de sustancia

substance flow rate - caudal de sustancia

substance fraction - fracción de sustancia

substance rate - caudal de sustancia

subtherapeutic level - concentración subterapéutica

substrate - sustrato

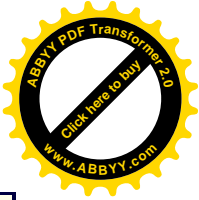
subtilisin - subtilisina

succinateCoA ligase (GDP-forming) - succinatoCoA-ligasa (formadora de GDP)

succinate-semialdehyde dehydrogenase - succinato-semialdehído-deshidrogenasa

succinate-semialdehyde dehydrogenase [NAD(P)+] - succinato-semialdehído-deshidrogenasa [NAD(P)+]

succinic semialdehyde dehydrogenase - succinato-semialdehído-deshidrogenasa



succinic thiokinase - succinatoCoA-ligasa (formadora de GDP)

succinyl-CoA synthetase - succinatoCoA-ligasa (formadora de GDP)

succinylcholine - suxametonio

sucrase - sucrosa-a-glucosidasa

sucrase-isomaltase - 1. oligo-1,6-glucosidasa 2. sucrosa-a-glucosidasa

sucrose agar - agar-sacarosa

sucrose a-glucohydrolase - sucrosa-a-glucosidasa

sucrose a-glucosidase - sucrosa-a-glucosidasa

sulbactam - sulbactam

sulfadiazine - sulfadiazina

sulfamethazine - sulfadimidina

sulfamethoxazole - sulfametoxazol

sulfatase - arilsulfatasa

sulfation factor - somatomedina

sulfisoxazole - sulfafurazol

sulfite oxidase - sulfito-oxidasa

sulfocyanide - tiocianato

sulfoglucosamine sulfamidase - N-sulfoglucosamina-sulfohidrolasa

N-sulfoglucosamine sulfohydrolase - N-sulfoglucosamina-sulfohidrolasa

sulfoiduronidate sulfatase - iduronato-2-sulfatasa

sulfokinase - aril-sulfotransferasa

sulfur granule (Actinomyces) - gránulo de azufre (Actinomyces)



supercoil - superhélice

supercoiled DNA - DNA superhelicoidal

superhelical DNA - DNA superhelicoidal

superhelical turn - vuelta superhelicoidal

superhelix - superhélice

superoxide dismutase - superóxido-dismutasa

suppository - supositorio

surface tension: tensión superficial

surfactant: (agente) tensoactivo

surrepressive mutation: mutación superrepresiva

surrogate genetics: mutagénesis inversa

swab: hisopo; torunda

surrogate marker: marcador indirecto

sweat - sudor

symptom - síntoma

symptomatology - sintomatología

synaptonemal complex - complejo sinaptonémico

syndrome - síndrome

synergetic - sinérgico -ica

synergism - 1. sinergia. 2. potenciación

synergy test - prueba de la sinergia

synovial fluid - líquido sinovial

synthetic enzyme analogue - enzima sintética



synzyme - enzima sintética

syrup - jarabe

system - sistema

systematic error - error sistemático

system of measurement - sistema de medición

T

T3 - triiodotironina

T4 - tiroxina

T-cell - linfocito T

T lymphocyte - linfocito T

tablet - comprimido

tachysterol3 - tacalcio

tailing - prolongación

Tamm-Hofsfall proteinuria - proteinuria de Tamm-Hofsfall

tandem repeat - repetición en tándem

tapeworm - cestodo

Taq DNA polymerase - DNA-polimerasa dirigida por DNA

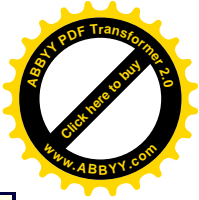
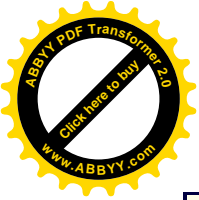
target - diana

target value - valor asignado

taxonomy - taxonomía

TDM - monitoreo de fármacos terapéuticos

technique - técnica



teicoplanin - teicoplanina

tellurite reduction test - prueba de reducción de la telurita

temperate phage - fago atenuado

temperature - temperatura

template - molde

terminal addition enzyme - DNA-nucleotidilexotransferasa

terminal deoxyribonucleotidyltransferase - DNA-nucleotidilexotransferasa

terminal transferase - DNA-nucleotidilexotransferasa

terminator - terminador

test - 1. prueba 2. ensayo 3. análisis 4. examen 5. exploración

test tube - tubo de ensayo

testicle - testículo

testing laboratory - laboratorio de ensayo

testosterone - testosterona

testosterone 17 β -dehydrogenase (NADP⁺) - testosterona-17 β -deshidrogenasa (NADP⁺)

testosterone isomerase - esteroide-D-isomerasa

tetracosactide - tetracosáctida

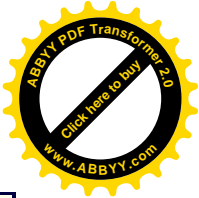
tetracycline - tetraciclina

tetrahydrofolate aminomethyltransferase - aminometiltransferasa

tetrahydrofolate dehydrogenase - dihidrofolato-reductasa

tetrahydropteroylglutamate methyltransferase - 5-metiltetrahidrofolato-homocisteína-S-metiltransferasa

tetrathionate broth - caldo con tetrationato



tetrazolium tolerance - tolerancia al tetrazolio

Thayer-Martin agar - agar de Thayer-Martin

theofibrate - clofibrato de etofilina

theophylline - teofilina

therapeutic drug monitoring - monitoreo de fármacos terapéuticos

therapeutic index - índice terapéutico

therapeutic level - concentración terapéutica

therapeutic range - intervalo terapéutico

thermal conductivity detector - detector de conductividad térmica

thermodynamic temperature - temperatura termodinámica

thermolysin - termolisina

thermosensitive mutation - mutación termosensible

thiaminase - tiaminasa

thiaminase II - tiaminasa

thiamine - tiamina

thiamphenicol - tiamfenicol

thin-layer chromatography - cromatografía en capa fina

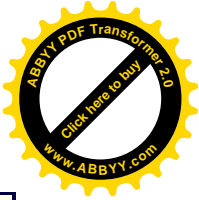
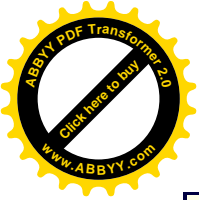
thioglucosidase - tioglucosidasa

thioglycolate broth - caldo con tioglicolato

thioltransacetylase A - dihidrolipoamida-S-acetiltransferasa

b-thionase - cistationina-b-sintasa

thoracentesis - toracocentesis



threonine - treonina

threonine - treonina

thrombin - trombina

thrombocyte - trombocito; plaqueta

thrombokinas - factor Xa de la coagulación

thromboxane-A synthase - tromboxano-A-sintasa

thromboxane synthase - tromboxano-A-sintasa

thymidine 5'-diphosphate - 5'-difosfato de timidina

thymidine kinase - timidina-cinasa

thymidine 5'-phosphate - 5'-fosfato de timidina

thymidine 5'-triphosphate - 5'-trifosfato de timidina

thymidine - timidina

thymine - timopoyetina

thymine - timina

thymonuclease - desoxirribonucleasa I

thyrocalcitonin - calcitonina

thyroid - glándula tiroidea

thyroid-stimulating hormone - tirotropina

thyroliberin - tiroliberina

thyropexin - tiropexina

thyrotrophin - tirotropina

thyrotropic hormone - tirotropina

thyrotropin - tirotropina



thyrotropin-releasing factor - tiroliberina

thyroxine - tiroxina

thyroxine binding globulin - globulina enlazante de la tiroxina

thyroxine deiodinase - tiroxina-desiodinasa

thyroxine 5-deiodinase - tiroxina-desiodinasa

ticarcillin - ticarcilina

tick - garrapata

time resolved fluoroimmunoassay - fluoroinmunoanálisis de resolución tardía

tinidazole - tinidazol

tissue carboxypeptidase A - carboxipeptidasa A

tissue carboxypeptidase B - carboxipeptidasa B

tissue kallikrein - calicreína hística

tissue plasminogen activator - activador del t-plasminógeno

tissue polypeptide antigen - antígeno polipeptídico hístico

titration - valoración

TM - medio de transporte

tobramycin - tobramicina

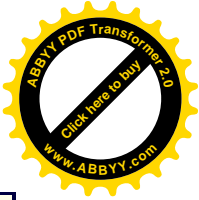
tocochromanol-3 - 5,7,8-trimetiltocotrienol

a-tocopherol - a-tocoferol

tolbutamide - tolbutamida

tolerance test - prueba de tolerancia

total blood - sangre



total calcium - calcio

total error - error total

total protein - proteína

toxic level - concentración tóxica

toxicology - toxicología

toxin - toxina

TPHA - prueba de hemaglutinación para *Treponema pallidum*

trace analysis - **1.** análisis de oligoelementos **2.** análisis de elementos traza

trace element - **1.** oligoelemento **2.** elemento traza

traceability - trazabilidad

tracer - trazador

trailer sequence - secuencia remolque

training - adiestramiento; aprendizaje

transfer ribonucleic acid - ácido ribonucleico transferente

transferability - transferibilidad

transaminase A - aspartato-transaminasa

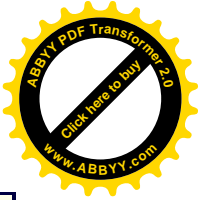
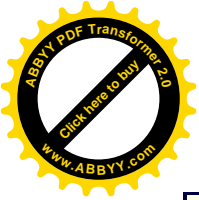
transaminasemia - **1.** concentración de alanina-aminotransferasa en plasma
2. concentración de alanina-aminotransferasa en suero **3.** concentración de aspartato-aminotransferasa en plasma **4.** concentración de aspartato-aminotransferasa en suero

transcript - transcrito; transcripto

transcription - transcripción

transcript mapping - cartografía del transcrito

transducer - transductor



transducing phage - fago transductor

transfer - transferencia

transfer factor - factor de transferencia

transfer RNA - RNA de transferencia

transferability - transferibilidad

transferase - transferasa

transferrin - transferrina

transformant - transformado

transgenic - transgénico -ica

transglutaminase - proteína-glutamina-g-glutamiltransferasa

transketolase - transcetolasa

translation - traducción

translational feedback regulation - retroregulación traduccional

transmission - transmisión

transmission factor - factor de transmisión

transmittance - transmitancia

transphosphoribosidase - 1. adenina-fosforribosiltransferasa 2. hipoxantina-fosforribosiltransferasa

transponible - transponible

transport - transporte

transport medium - medio de transporte

transport number - número de transporte

transposable element - elemento transponible



transposon - transposón

transtyretin - transtiretina

transudate - trasudado

transversal comparison - comparación transversal

a,a-trehalase - a,a-trealasa

trend - tendencia

TRF - tiroliberina

triacechthylleandomycin - troleandomicina

triacylglycerol lipase - triacilglicerol-lipasa

tributyrase - triacilglicerol-lipasa

triglyceride - triglicérido

triglyceride lipase - triacilglicerol-lipasa

triglyceridemia - **1.** concentración de triglicérido en plasma **2.** concentración de triglicérido en suero

1a,24R,25-trihydroxycholecalciferol - calcitrol

triiodothyronine - triiodotironina

trimethoprim - trimetoprima

trimethylamine oxidase - trimetilamina-N-óxido-reductasa

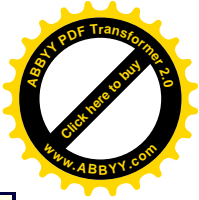
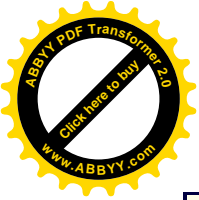
trimethylamine-N-oxide reductase - trimetilamina-N-óxido-reductasa

triosephosphate dehydrogenase - gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa

triosephosphate dehydrogenase (NADP+) - gliceraldehído-3-fosfato- deshidrogenasa (NADP+) (fosforilante)

triose-phosphate isomerase - triosa-fosfato-isomerasa

triosephosphate mutase - triosa-fosfato-isomerasa



triphosphatase - adenosintrifosfatasa

triple sugar iron agar - agar con hierro y tres azúcares

triterpenol esterase - esteroles-esterasa

Tritirachium alkaline proteinase - endopeptidasa K

triethanolamine - trolamina

troleandomycin - troleandomicina

trophozoite - trofozoito

troponin T - troponina T

trough - concentración mínima

trough level - concentración mínima

true cholinesterase - acetilcolinesterasa

true negative - negativo verdadero

true positive - positivo verdadero

true value - valor verdadero

trueness - veracidad

trypsin - tripsina

a- and b-trypsin - tripsina

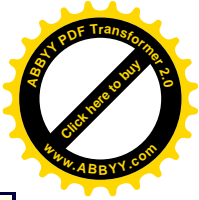
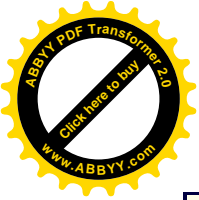
trypsinogen kinase - aspergillopepsina I

trypticase soy broth - caldo con tripticasa de soja

tryptophan - triptófano

tryptophan 5-hydroxylase - triptófano-5-monoxigenasa

tryptophan 5-monooxygenase - triptófano-5-monoxigenasa



trypsin - tripsina

TSH - tirotropina

tube agglutination test - prueba de aglutinación en tubo

tuberculin test - prueba de la tuberculina

tumor marker - marcador tumoral

tumor suppressor gene - gen oncosupresor

turbidimetric immunoassay - inmunoanálisis turbidimétrico

turbidimetry - turbidimetría

turnaround time - 1. tiempo de entrega 2. tiempo de respuesta

turnover - 1. recambio metabólico 2. ciclo metabólico

twisting number - número de vueltas helicoidales

two-dimensional gel electrophoresis - electroforesis bidimensional en gel

type I DNA topoisomerase - DNA-topoisomerasa

typing - tipificación

tyraminase - amina-oxidasa (flavinífera)

tyramine oxidase - amina-oxidasa (flavinífera)

tyrosinase - monofenol-monoxigenasa

tyrosine - tirosina

tyrosine aminotransferase - tirosina-transaminasa

tyrosine decarboxylase - tirosina-descarboxilasa

tyrosine 3-hydroxylase - tirosina-3-monoxigenasa

tyrosine 3-monooxygenase - tirosina-3-monoxigenasa

tyrosine transaminase - tirosina-transaminasa



U

UDP-N-acetylglucosaminelysosomal-enzyme-N-ACETY G

UCOSAMINEPHOSPHOTRANSFERASE - UDP-N-acetilglucosaminaenzima-lisosómica-N -acetilglucosaminafosfotransferasa

UDPgalactose 4-epimerase - UDPglucosa-4-epimerasa

UDPgalactoseglucose galactosyltransferase - lactosa-sintasa

UDPgalactoseglycoprotein galactosyltransferase - b-N-acetilglucosaminilglicopéptido-b-1,4-galactosiltransferasa

UDPglucose 4-epimerase - UDPglucosa-4-epimerasa

UDPglucoseglycogen glucosyltransferase - glucógeno-sintasa

UDPglucosehexose-1-phosphate uridylyltransferase - UDPglucosahexosa-1-fosfato-uridililtransferasa

UDPglucose pyrophosphorylase - UTPglucosa-1-fosfato-uridililtransferasa

UDP glucoronyl transferase - glucoronosiltransferasa

ultracentrifugation - ultracentrifugación

ultracentrifuge - ultracentrifugadora; ultracentrífuga

ultrafiltration - ultrafiltración

ultrasensitive - [con el significado de] **1.** con una gran detectabilidad **2.** con un límite de detección muy pequeño

unbound - no unido

uncertainty (of measurement) - incertidumbre (de medida)

unified atomic mass unit - unidad de masa atómica unificada

unit (of measurement) - unidad (de medida)

untwisting enzyme - DNA-topoisomerasa



unwinding protein - proteína desenrolladora

up mutation - mutación aceleradora

up promoter mutation - mutación aceleradora

upstream - en dirección 5'

uracile - uracilo

urate - [ácido úrico más ion urato] urato

urate oxidase - urato-oxidasa

urea - urea

urea hydrolysis test - prueba de hidrólisis de la urea

urease - ureasa

uremia -[con el significado de] **1.** concentración de urea en plasma **2.** concentración de urea en suero

urethral exudate - exudado uretral

uric acid - ácido úrico

uric acid - [cuando en realidad hace referencia a ácido úrico más ion urato] urato

uricase - urato-oxidasa

uricemia - **1.** concentración de urato en plasma **2.** concentración de urato en suero

uridine - uridina

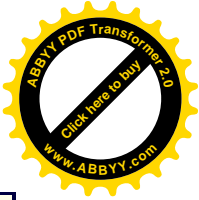
uridine 5'-diphosphate - 5'-difosfato de uridina

uridine kinase - uridina-cinasa

uridine 5'-phosphate - 5'-fosfato de uridina

uridine 5'-triphosphate - 5'-trifosfato de uridina

uridyl transferase - UDPglucosahexosa-1-fosfato-uridililtransferasa



urinalysis - análisis de orina (con tiras reactivas)

urinary cast - cilindro urinario

urinary kallikrein - calicreína hística

urinary plasminogen activator - activador del u-plasminógeno

urinary sediment - sedimento urinario

urinary stone - cálculo urinario

urine - orina

urine culture - urocultivo

urine sediment - sedimento urinario

urobilinogen - urobilinógeno

urocanase - urocanato-hidratasa

urocanate hydratase - urocanato-hidratasa

urokinase - enzima activadora del u-plasminógeno

urolith - cálculo urinario

uroporphyrin - uroporfirina

uroporphyrinogen-III cosynthase - uroporfirinógeno-III-sintasa

uroporphyrinogen decarboxylase - uroporfirinógeno-descarboxilasa

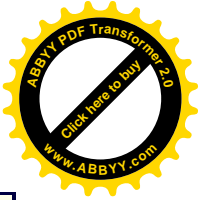
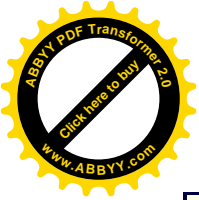
uroporphyrinogen I synthase - hidroximetilbilano-sintasa

uroporphyrinogen-III synthase - uroporfirinógeno-III-sintasa

UTPglucose-1-phosphate uridylyltransferase- UTPglucosa-1-fosfato- uridililtransferasa

UTPhexose-1-phosphate uridylyltransferase- UTPhexosa-1-fosfato- uridililtransferasa

V



vaginal contents- contenido vaginal

vaginal secretrion- secrección vaginal

valine - valina

valineisoleucine transaminase - valina3-metil-2-oxovalerato-transaminasa

valine3-methyl-2-oxovalerate transaminase - valina3-metil-2-oxovalerato- transaminasa

valproic acid - [fármaco] ácido valproico

valproic acid - [cuando en realidad hace referencia a ácido valproico más ion valproato]
ácido valproico

value - valor

van de Kamer test - determinación de lípido en heces

vancomycin - vancomicina

vanilmandelic acid - **1.** ácido 4-hidroxi-3-metoximandélico **2.** 4-hidroxi- 3-metoximandelato

variable - variable

variable-focus condenser - condensador de foco variable

variance - variancia

vasopressin - vasopresina

vector - vector

velocity - velocidad

venombin A - venombina A

venom exonuclease - exonucleasa de veneno

venom phosphodiesterase - exonucleasa de veneno

venous blood - sangre venosa

Vero cell - célula Vero



versus - 1. contra 2. frente a 3. comparado con

vertebrate collagenase - colagenasa intersticial

very-long-chain acyl-CoA synthase - ácido graso de cadena largaCoA-ligasa

very-long-chain acyl-CoA synthetase - ácido graso de cadena-largaCoA-ligasa

vial - vial

Vincent's bacillus - Fusobacterium fusiforme

viral oncogene - oncogén vírico

viral transport medium - medio de transporte de virus

viremia - viremia

virion - virión

viroid - viroide

virus - virus

viscosity - viscosidad

vitamin - vitamina

vitamin A - [con el significado de] retinol

vitamin A1 - retinol

vitamin A acid - ácido retinoico

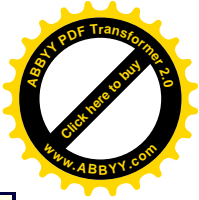
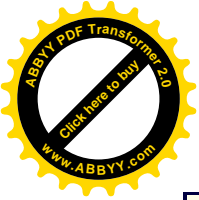
vitamin A1 acid - ácido retinoico

vitamin A alcohol - retinol

vitamin A1 alcohol - retinol

vitamin A aldehyde - retinal

vitamin A1 aldehyde - retinal



vitamin D - [con el significado de] calciol

vitamin D2 -ercalciol

vitamin E - [con el significado de] a-tocoferol

V D cholesterol - colesterol de lipoproteínas de muy baja densidad; colesterol de V D

VMA - **1.** ácido 4-hidroxi-3-metoximandélico. **2.** 4-hidroxi-3-metoximandelato

Voges-Proskauer test - prueba de Voges-Proskauer

volatile fatty acid - ácido graso volátil

volt - volt

volume - volumen

volume flow rate - caudal de volumen

volume fraction - fracción de volumen

volume rate - caudal de volumen

volumic - volúmico -ica

volumic mass - masa volúmica

volumetric flask - matraz aforado

volumetric pipet - pipeta aforada

volumetry - volumetría

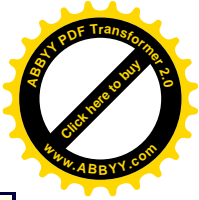
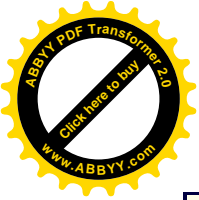
vortex - vórtice

vortex mix - mezcla vorticial

VP - vasopresina

V8 proteinase - glutamil-endopeptidasa

W



watt - watt

waived testing - pruebas dispensadas

wavelength - longitud de onda

wavenumber - número de onda

waxy cast - cilindro céreo

WBC - leucocito

WBC cast - cilindro leucocitario

WBC count - **1.** concentración de leucocitos en sangre. **2.** medida de la concentración de leucocitos. **3.** recuento de leucocitos

WBC differential count - recuento diferencial leucocitario; fórmula leucocitaria

weber - weber

Weeks bacillus - Haemophilus influenzae

weight - peso

Welch's bacillus - Clostridium perfringens

Welch-Frankel's bacillus - Clostridium perfringens

western blot - transferencia western

white cell - leucocito

Whitmore's bacillus - Pseudomonas pseudomallei

whole blood - sangre

within-run imprecision - imprecisión intraserial

within-subject biological variation - variación biológica intraindividual

Widal test - prueba de Widal

Wilkins-Chalgren agar - agar de Wilkins-Chalgren



workshop - 1. seminario 2. taller

worm - gusano

wound - herida

Wright stain - tinción de Wright

writhing number - número de vueltas superhelicoidales

X

xanthine oxidase - xantina-oxidasa

xenobiotic - xenobiótico -ica

X-His dipeptidase - X-His-dipeptidasa

X-Pro dipeptidase - X-Pro-dipeptidasa

xylan 1,4-b-xylosidase - xilano-1,4-b-xilosidasa

xylitol dehydrogenase - -xilulosa-reductasa

xylobiase - xilano-1,4-b-xilosidasa

xylose - xilosa

D-xylose - D-xilosa

D-xylose 1-dehydrogenase - D-xilosa-1-deshidrogenasa

-xylose 1-dehydrogenase - -xilosa-1-deshidrogenasa

D-xylose 1-dehydrogenase (NADP+) - D-xilosa-1-deshidrogenasa (NADP+)

xylose-lisine-deoxycholate agar - agar-xilosa-lisina-desoxicolato

b-xylosidase - xilano-1,4-b-xilosidasa

-xylulose reductase - -xilulosa-reductasa

Y



yeast extract - extracto de levadura

yeast protease C - carboxipeptidasa de tipo serina

Z

zeta potential - potencial zeta

zidovudine - zidovudina

Ziehl-Neelsen stain - tinción de Ziehl-Neelsen

zinc - zinc

zinc-finger - dedo de zinc

zygotene - cigotena

zymogen - zimógeno; proenzima

Bibliografía

1. European Committee for Clinical Laboratory Standards. Standard for quality assurance. Part 1: Terminology and general principles. (ECC S Document Vol.2, No.1). Berlin: Beuth Verlag, 1985.
2. International Anatomical Committee. Nomina anatomica, nomina histologica, nomina embryologica. Edimburg: Churchill Livingstone, 1989.
3. International Bureau of Weights and Measures, International Electrotechnical Commission, International Federation of Clinical Chemistry, International Organization for Standardization, International Union of Pure and Applied Chemistry, International Union of Pure and Applied Physics, International Organization of Legal Metrology. International vocabulary of basic and general terms in metrology. Genève, ISO, 1993.
4. International Federation of Clinical Chemistry. Approved recommendation (1978) on quality control in clinical chemistry. Part. 1. General principles and terminology. J Clin Chem Clin Biochem 1980; 18: 69-77.
5. International Federation of Clinical Chemistry. Approved IFCC recommendation on definitions of quantities and conventions related to blood gases and pH. Eur J Clin Chem Clin Biochem 1995;33:399-404.



6. International Organization for Standardization. Terms and definitions used in connection with reference materials. (ISO Guide 30:1992). Genève: ISO, 1992.
7. International Organisation for Standardization. Statistics - Vocabulary and Symbols - Part 1: Probability and general statistical terms (ISO 3534-1:1993). Genève: ISO, 1993.
8. International Union of Biochemistry and Molecular Biology. Biochemical nomenclature and related documents. London: Portland Press, 1992.
9. International Union of Biochemistry and Molecular Biology. Enzyme nomenclature. Recommendations 1992. San Diego: Academic Press, 1992.
10. International Union of Immunological Societies. Nomenclature of the alternative pathway of complement. J Immunol 1981;127:1261-1262.
11. International Union of Immunological Societies. Allergen nomenclature. Bulletin WHO 1984;64:767-770.
12. International Union of Microbiological Societies. International code of nomenclature of bacteria. Washington: American Society for Microbiology, 1975.
13. International Union of Microbiological Societies. Approved list of bacterial names. Washington: American Society for Microbiology, 1989.
14. International Union of Microbiological Societies. Index of the bacterial and yeast nomenclatural changes. Washington: American Society for Microbiology, 1989.
15. International Union of Microbiological Societies. Classification and Nomenclature of Viruses. Fifth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Basel: Karger, 1991.
16. International Union of Pure and Applied Chemistry. Nomenclature of organic chemistry. Sections A, B, C, D, E, F and H. Oxford: Pergamon, 1979.
17. International Union of Pure and Applied Chemistry. Compendium of chemical terminology. Oxford: Blackwell, 1987.
18. International Union of Pure and Applied Chemistry. Compendium of analytical nomenclature. Definitive rules 1987. Oxford: Blackwell, 1987.
19. International Union of Pure and Applied Chemistry. Nomenclature, symbols, units and their usage in spectrochemical analysis - VII. Molecular absorption spectroscopy, ultraviolet and visible (UV/VIS) (Recommendations 1988). Pure Appl Chem 1988; 60: 1449-1460.



20. International Union of Pure and Applied Chemistry. Nomenclature of inorganic chemistry. Recommendation 1990. Oxford: Blackwell, 1989.

21. International Union of Pure and Applied Chemistry. Nomenclature for sampling in analytical chemistry. Pure Appl Chem 1990; 62: 1193-1208.

22. International Union of Pure and Applied Chemistry. Recommendations for nomenclature and symbolism for mass spectroscopy (including an appendix of terms used in vacuum technology). Pure Appl Chem 1991; 63: 1541-11566.

23. International Union of Pure and Applied Chemistry. Compendium of macromolecular nomenclature. Oxford: Blackwell, 1991.

24. International Union of Pure and Applied Chemistry. Glossary for chemists of terms used in biotechnology. (IUPAC Recommendations 1992). Pure Appl Chem 1992;64: 143-168.

25. International Union of Pure and Applied Chemistry. Selection of terms, symbols and units related to microbial processes. Pure Appl Chem 1992; 64: 1047-1053.

26. International Union of Pure and Applied Chemistry. Quantities, units and symbols in physical chemistry. Oxford: Blackwell, 1993.

27. International Union of Pure and Applied Chemistry. Nomenclature for chromatography. (IUPAC Recommendations 1993). Pure Appl Chem 1993; 65: 819-872.

28. International Union of Pure and Applied Chemistry. Glossary for chemists of terms used in toxicology. (IUPAC Recommendations 1993). Pure Appl Chem 1993; 65: 2003-2122.

29. International Union of Pure and Applied Chemistry. Nomenclature of kinetic methods of analysis. Pure Appl Chem 1993; 65: 2291-2298.

30. International Union of Pure and Applied Chemistry. Glossary of terms used in physical organic chemistry. (IUPAC Recommendations 1994). Pure Appl Chem 1994; 66: 1077-1184.

31. International Union of Pure and Applied Chemistry. Nomenclature for radioanalytical chemistry. (IUPAC Recommendations 1994). Pure Appl Chem 1994; 66: 2513-2526.

32. International Union of Pure and Applied Chemistry. Recommendations for nomenclature of ion-selective electrodes. (IUPAC Recommendations 1994). Pure Appl Chem 1994; 66: 2527-2536.

33. International Union of Pure and Applied Chemistry. Nomenclature in laboratory robotics and automation. (IUPAC Recommendations 1994). Pure Appl Chem 1994; 66: 2513-2526.

34. International Union of Pure and Applied Chemistry. Glossary of bioanalytical
2522



nomenclature. Part 1: general terminology, body fluids, enzymology, immunology. (IUPAC Recommendations 1994). Pure Appl Chem 1994; 66: 2587-2604.

35. International Union of Pure and Applied Chemistry. Multilingual dictionary of analytical terms. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1994.

36. International Union of Pure and Applied Chemistry, International Federation of Clinical Chemistry. Approved recommendation (1985) on names, symbols, definitions and units of quantities in optical spectroscopy. J Clin Chem Clin Biochem 1987;25:327-336.

37. International Union of Pure and Applied Chemistry, International Federation of Clinical Chemistry. Approved recommendation (1987) on physico-chemical quantities and units in clinical chemistry with special emphasis on activities and activity coefficients. J Clin Chem Clin Biochem 1987; 25: 369-391.

38. International Union of Pure and Applied Chemistry, International Federation of Clinical Chemistry. Approved recommendation (1985) on names, symbols, definitions and units of quantities in optical spectroscopy. J Clin Chem Clin Biochem 1987;25:327-336.

39. International Union of Pure and Applied Chemistry, International Federation of Clinical Chemistry. Approved recommendation (1987) on physico-chemical quantities and units in clinical chemistry with special emphasis on activities and activity coefficients. J Clin Chem Clin Biochem 1987; 25: 369-391.

40. International Union of Pure and Applied Chemistry, International Federation of Clinical Chemistry. Nomenclature for automated and mechanised analysis. Eur J Clin Chem Clin Biochem 1991;29;577-585.

41. International Union of Pure and Applied Chemistry, International Federation of Clinical Chemistry. Quantities and units for metabolic processes as a function of time. (Recommendation 1992). Eur J Clin Chem Clin Biochem 1992;30:901-905.

42. International Union of Pure and Applied Chemistry, International Federation of Clinical Chemistry. Quantities and units for electrophoresis in the clinical laboratory. (IUPAC Recommendation 1994). Pure Appl Chem 1994;66:891-896.

43. International Union of Pure and Applied Chemistry, International Federation of Clinical Chemistry. Quantities and units for centrifugation in the clinical laboratory. (IUPAC Recommendations 1994). Pure Appl Chem 1994;66:897-907.

44. International Union of Pure and Applied Chemistry, International Federation of Clinical Chemistry. Compendium of terminology and nomenclature of properties in clinical laboratory sciences (Recommendations 1995). Oxford: Blackwell Science, 1995.

45. World Health Organisation. International nonproprietary names (INN) for pharmaceutical
2523



substances. Genève: WHO, 1988.

46. Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular. Terminología bioquímico-clínica: enzimas. Barcelona: SEQC, 1994.



Notas finales

1 (Ventana-emergente - Popup)

Preparation and Testing of Reagent Water in the Clinical Laboratory, ed 2, NCCLS Approved Guideline C3-A2 Villanova, PA, 1991, National Committee for Clinical Laboratory Standards.

2 (Ventana-emergente - Popup)

Gabler, R, Hegde, R, and Hughes, D:

Degradation of high purity water on storage, J Liquid Chromatog 6:2565-2570, 1983.

3 (Ventana-emergente - Popup)

Gabler, R, Hegde, R, and Hughes, D:

Degradation of high purity water on storage, J Liquid Chromatog 6:2565-2570, 1983.

4 (Ventana-emergente - Popup)

Winstead, M:

Reagent grade water: How, when and why? American Society of Medical Technologists, Austin, Texas, 1967. Steck Co.

5 (Ventana-emergente - Popup)

Preparation and Testing of Reagent Water in the Clinical Laboratory, ed 2, NCCLS Approved Guideline C3-A2 Villanova, PA, 1991, National Committee for Clinical Laboratory Standards.

6 (Ventana-emergente - Popup)

Preparation and Testing of Reagent Water in the Clinical Laboratory, ed 2, NCCLS Approved Guideline C3-A2 Villanova, PA, 1991, National Committee for Clinical Laboratory Standards.

7 (Ventana-emergente - Popup)

Jorgenson, JH, Smith, RF:

Rapid detection of contaminated intravenous fluids using the Limulus in vitro endotoxin assay, Appl Microbiol 26:521-524, 1973.

Sullivan, JD Jr, Valoes, FW, Watson, SW:

Endotoxins: the Limulus amebocyte lysate system. In Mechanisms in bacterial toxicology, AW Bernheimer (ed) New York, 1976, John Wiley & Sons, Inc, p. 217.

8 (Ventana-emergente - Popup)

Preparation and Testing of Reagent Water in the Clinical Laboratory, ed 2, NCCLS Approved Guideline C3-A2 Villanova, PA, 1991, National Committee for Clinical Laboratory Standards.

9 (Ventana-emergente - Popup)

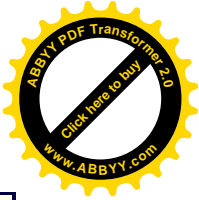
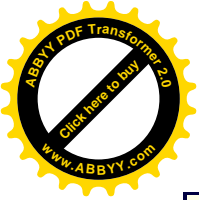
Bristol, DW:

Detection of trace organic impurities in binary solvent systems. A solvent purity test, J Chromatog 188:193, 1980.

10 (Ventana-emergente - Popup)

Preparation and Testing of Reagent Water in the Clinical Laboratory, ed 2, NCCLS Approved Guideline C3-A2 Villanova, PA, 1991, National Committee for Clinical Laboratory Standards.

Clinical Laboratory Technical Procedure Manuals, Second Edition. NCCLS Approved



Standard GP2-A2 Villanova, PA 1992. National Committee for Clinical Laboratory Standards.

11 (Ventana-emergente - Popup)

Statement from Quadrennial Symposium on Measurable Properties (Quantities) and Units in Clinical Chemistry, Gaithersburg, MD. August 5 and 6, 1976. Am J Clin Pathol 71:465-468, 1979.

12 (Ventana-emergente - Popup)

Clinical Chemistry: Theory, analysis, and correlation. ed 2, Kaplan, LA and Pesce, AJ, St. Louis, MO, 1989, Mosby.

13 (Ventana-emergente - Popup)

Determining Performance of Volumetric Equipment, NCCLS Proposed Standard I8-P, Villanova, PA, 1984, National Committee for Clinical Laboratory Standards.

14 (Ventana-emergente - Popup)

Determining Performance of Volumetric Equipment, NCCLS Proposed Standard I8-P, Villanova, PA, 1984, National Committee for Clinical Laboratory Standards.

15 (Ventana-emergente - Popup)

Determining Performance of Volumetric Equipment, NCCLS Proposed Standard I8-P, Villanova, PA, 1984, National Committee for Clinical Laboratory Standards.

16 (Ventana-emergente - Popup)

Lide DR:

Handbook of Chemistry and Physics, ed 76, Boca Raton, Fla., 1995, CRC Press.

17 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Lashor TW, Macurdy, LB:

Precision laboratory standards of mass and laboratory weights. National Bureau of Standards Circular 547, Washington, DC, 1954. United States Department of Commerce.

18 (Ventana-emergente - Popup)

Lashor TW, Macurdy, LB:

Precision laboratory standards of mass and laboratory weights. National Bureau of Standards Circular 547, Washington, DC, 1954. United States Department of Commerce.

McCoubrey, AO:

Guide for the use of the international system of units: the modernized metric system. National Institute of Standards and Technology Spec Publ 811, Washington, DC, 1991, United States Department of Commerce.

The National Committee for Clinical Laboratory Standards Position Paper (PPC-11): quantities and units (SI), Clin Chem 25:657-658, 1979.

Committee on Hospital Care, American Academy of Pediatrics: Metrication and SI units. Pediatrics 65:659-664, 1980.

19 (Ventana-emergente - Popup)

McCoubrey, AO:

Guide for the use of the international system of units: the modernized metric system. National Institute of Standards and Technology Spec Publ 811, Washington, DC, 1991, 2526



United States Department of Commerce.

20 (Ventana-emergente - Popup)

Clinical Chemistry: Theory, analysis, and correlation. ed 2, Kaplan, LA and Pesce, AJ, St. Louis, MO, 1989, Mosby.

21 (Ventana-emergente - Popup)

Laboratory Instrument Maintenance Manual, Skokie, IL, 1989, p 99, College of American Pathologists.

22 (Ventana-emergente - Popup)

Temperature calibration of water baths, instruments, and temperature sensors, ed 2, NCCLS Approved Standard I2 - A2, Villanova, PA, 1990. National Committee for Clinical Laboratory Standards.

23 (Ventana-emergente - Popup)

Temperature calibration of water baths, instruments, and temperature sensors, ed 2, NCCLS Approved Standard I2 - A2, Villanova, PA, 1990. National Committee for Clinical Laboratory Standards.

24 (Ventana-emergente - Popup)

Temperature calibration of water baths, instruments, and temperature sensors, ed 2, NCCLS Approved Standard I2 - A2, Villanova, PA, 1990. National Committee for Clinical Laboratory Standards.

25 (Ventana-emergente - Popup)

Temperature calibration of water baths, instruments, and temperature sensors, ed 2, NCCLS Approved Standard I2 - A2, Villanova, PA, 1990. National Committee for Clinical Laboratory Standards.

26 (Ventana-emergente - Popup)

Procedures for the handling and processing of blood specimens, NCCLS Approved Guideline H18-A, Villanova, PA, 1990, National Committee for Clinical Laboratory Standards.

27 (Ventana-emergente - Popup)

Laboratory instrument evaluation and verification manual, College of American Pathologists, Skokie, Ill., 1989, p111.

28 (Ventana-emergente - Popup)

A centrifuge primer, Palo Alto CA, 1980, Spinco Div. Beckman Instruments, Inc.

29 (Ventana-emergente - Popup)

A centrifuge primer, Palo Alto CA, 1980, Spinco Div. Beckman Instruments, Inc.

30 (Ventana-emergente - Popup)

Occupational Safety and Health Administration (Department of Labor): Occupational exposures to hazardous chemicals in laboratories: final rule, Federal Register, 29 CFR Part 1910.1450, 55(21): 300-3335, Jan 31, 1990.

31 (Ventana-emergente - Popup)

Occupational Safety and Health Administration (Department of Labor) Occupational exposure to bloodborne pathogens: final rule, Federal Register, 29 CFR Part 1910.1030, (235):64003-64182, Dec 6, 1991.

32 (Ventana-emergente - Popup)

Occupational Safety and Health Administration (Department of Labor): Occupational exposures to hazardous chemicals in laboratories: final rule, Federal Register, 29 CFR Part 2527



1910.1450, 55(21): 300-3335, Jan 31, 1990.

33 (Ventana-emergente - Popup)

Sigma-Aldrich Library of Chemical Safety Data, Sigma Chemical Co, St. Louis, MO (available in written or CD-ROM formats).

34 (Ventana-emergente - Popup)

Occupational Safety and Health Administration (Department of Labor): Occupational exposures to hazardous chemicals in laboratories: final rule, Federal Register, 29 CFR Part 1910.1450, 55(21): 300-3335, Jan 31, 1990.

35 (Ventana-emergente - Popup)

Sigma-Aldrich Library of Chemical Safety Data, Sigma Chemical Co, St. Louis, MO (available in written or CD-ROM formats).

Lan G, Sansone EB:

Destruction of hazardous chemicals in the laboratory, New York, 1990, John Wiley & Sons.

36 (Ventana-emergente - Popup)

Occupational Safety and Health Administration (Department of Labor) Occupational exposure to bloodborne pathogens: final rule, Federal Register, 29 CFR Part 1910.1030, (235):64003-64182, Dec 6, 1991.

37 (Ventana-emergente - Popup)

United States Department of Health and Human Services: Recommendations for prevention of HIV transmission in health care setting, Morbidity, Mortality Weekly Report 56(25), Aug 21, 1987.

38 (Ventana-emergente - Popup)

Rutale WA, Weber DJ:

Infectious waste-mismatch between science and policy: soundboard, N Engl J Med 325:578-581, 1991.

39 (Ventana-emergente - Popup)

Campbell JM and Campbell JP:

Laboratory mathematics: medical and biological applications, ed 4, St. Louis, 1990, C.V. Mosby.

40 (Ventana-emergente - Popup)

Este cuadro solo ofrece una guía general. Debido a la variabilidad en la ejecución de cada proceso y en la fuente de suministro de agua, se recomienda a los usuarios que consulten a una compañía con gran reputación en la fabricación de equipo para purificación de agua antes de seleccionar un sistema para el laboratorio.

41 (Ventana-emergente - Popup)

La resistividad del agua purificada por destilación es un orden de menos importancia que el del agua purificada por desionización, debido a la presencia de CO₂ y algunas veces H₂S, NH₃, y otros gases ionizados que pueden estar presentes en la fuente de obtención del agua.

42 (Ventana-emergente - Popup)

Tratamiento con ozono, aunque actualmente no es de uso común en los sistemas de purificación de agua para los laboratorios clínicos, ha demostrado ser efectivo en la oxidación de bacterias, virus, y sus metabolitos orgánicos.



43 (Ventana-emergente - Popup)

Tratamiento con ozono, aunque actualmente no es de uso común en los sistemas de purificación de agua para los laboratorios clínicos, ha demostrado ser efectivo en la oxidación de bacterias, virus, y sus metabolitos orgánicos.

44 (Ventana-emergente - Popup)

Tratamiento con ozono, aunque actualmente no es de uso común en los sistemas de purificación de agua para los laboratorios clínicos, ha demostrado ser efectivo en la oxidación de bacterias, virus, y sus metabolitos orgánicos.

45 (Ventana-emergente - Popup)

Tratamiento con ozono, aunque actualmente no es de uso común en los sistemas de purificación de agua para los laboratorios clínicos, ha demostrado ser efectivo en la oxidación de bacterias, virus, y sus metabolitos orgánicos.

46 (Ventana-emergente - Popup)

La concentración residual de los sólidos ionizados disueltos es parcialmente dependiente de la concentración original en la fuente de obtención del agua.

47 (Ventana-emergente - Popup)

Tratamiento con ozono, aunque actualmente no es de uso común en los sistemas de purificación de agua para los laboratorios clínicos, ha demostrado ser efectivo en la oxidación de bacterias, virus, y sus metabolitos orgánicos.

48 (Ventana-emergente - Popup)

Tratamiento con ozono, aunque actualmente no es de uso común en los sistemas de purificación de agua para los laboratorios clínicos, ha demostrado ser efectivo en la oxidación de bacterias, virus, y sus metabolitos orgánicos.

49 (Ventana-emergente - Popup)

El carbón activado removerá cloro por adsorción.

50 (Ventana-emergente - Popup)

Tratamiento con ozono, aunque actualmente no es de uso común en los sistemas de purificación de agua para los laboratorios clínicos, ha demostrado ser efectivo en la oxidación de bacterias, virus, y sus metabolitos orgánicos.

51 (Ventana-emergente - Popup)

Cuando es usado en otros procesos de purificación, como carbón activado de grado especial y otros absorbentes sintéticos muestra una excelente capacidad para remover contaminantes orgánicos.

52 (Ventana-emergente - Popup)

Tratamiento con ozono, aunque actualmente no es de uso común en los sistemas de purificación de agua para los laboratorios clínicos, ha demostrado ser efectivo en la oxidación de bacterias, virus, y sus metabolitos orgánicos.

53 (Ventana-emergente - Popup)

Tratamiento con ozono, aunque actualmente no es de uso común en los sistemas de purificación de agua para los laboratorios clínicos, ha demostrado ser efectivo en la oxidación de bacterias, virus, y sus metabolitos orgánicos.

54 (Ventana-emergente - Popup)

Tratamiento con ozono, aunque actualmente no es de uso común en los sistemas de purificación de agua para los laboratorios clínicos, ha demostrado ser efectivo en la oxidación de bacterias, virus, y sus metabolitos orgánicos.



55 (Ventana-emergente - Popup)

Tratamiento con ozono, aunque actualmente no es de uso común en los sistemas de purificación de agua para los laboratorios clínicos, ha demostrado ser efectivo en la oxidación de bacterias, virus, y sus metabolitos orgánicos.

56 (Ventana-emergente - Popup)

Ultrafiltros son útiles en la disminución de contaminantes orgánicos específicos en la fuente de obtención de agua, basado en el límite del peso molecular de la membrana.

57 (Ventana-emergente - Popup)

Tratamiento con ozono, aunque actualmente no es de uso común en los sistemas de purificación de agua para los laboratorios clínicos, ha demostrado ser efectivo en la oxidación de bacterias, virus, y sus metabolitos orgánicos.

58 (Ventana-emergente - Popup)

Tratamiento con ozono, aunque actualmente no es de uso común en los sistemas de purificación de agua para los laboratorios clínicos, ha demostrado ser efectivo en la oxidación de bacterias, virus, y sus metabolitos orgánicos.

59 (Ventana-emergente - Popup)

185 nm oxidación UV (sistema de proceso en serie) es útil en remover trazas de contaminantes orgánicos cuando se usa después de un tratamiento. La preparación de la fuente de obtención de agua juega un papel crítico en el funcionamiento de los procesadores en serie, ellos no deberían ser confundidos con los esterilizadores UV alineados el cual usan 254 nm de radiación UV para inactivar bacterias.

60 (Ventana-emergente - Popup)

Tratamiento con ozono, aunque actualmente no es de uso común en los sistemas de purificación de agua para los laboratorios clínicos, ha demostrado ser efectivo en la oxidación de bacterias, virus, y sus metabolitos orgánicos.

61 (Ventana-emergente - Popup)

254 nm esterilizadores UV aunque no físicamente remueven bacterias pueden ser que tengan una capacidad bactericida o bacteriostática limitada por: intensidad, contacto, tiempo y velocidad de flujo.

62 (Ventana-emergente - Popup)

Preferiblemente, el agua Tipo I debe estar libre de bacterias.

63 (Ventana-emergente - Popup)

Esta especificación es una especificación del proceso y no es medida por el usuario final.

64 (Ventana-emergente - Popup)

Esta especificación es una especificación del proceso y no es medida por el usuario final.

65 (Ventana-emergente - Popup)

Por lo menos, deben incluirse algunas formas de carbón activado en un sistema de obtención de agua como reactivo como pre-tratamiento para ayudar a eliminar contaminantes orgánicos encontrados en suministros de agua cruda. Aún más, el tratamiento posterior con grados especiales de carbón puede ser indicado para aplicaciones que requieren niveles extremadamente bajos de contaminantes orgánicos. Debido a que la función del carbón usado como pretratamiento y post-tratamiento es específico para un sitio, es necesario consultar con el fabricante para un recomendado reemplazo. (ver también [nota \(e\), Tabla 1.](#))



66 (Ventana-emergente - Popup)

Las especificaciones del agua como un reactivo definidas en esta tabla son aquellas para el agua al tiempo de su producción. Agua Tipo I no puede ser almacenada porque su resistividad puede disminuir y los metales o contaminantes orgánicos se fugan del recipiente que los contiene. También puede ocurrir contaminación bacteriana.

67 (Ventana-emergente - Popup)

Para ciertos propósitos, pueden ser necesarios requerimientos adicionales a los especificados para agua tipo I. Esta columna enlista varios de estos propósitos.

68 (Ventana-emergente - Popup)

Cuando se requieren determinaciones exactas de especies químicas elementos traza o metales pesados al nivel de los $\mu\text{g/L}$ (partes por billón), el agua usada debe ser probada para las especies trazas en consideración. Si esta presente, tal especie traza puede ser tolerada solo a la concentración que no es significativa para el nivel de concentración al que se lleva a cabo el análisis.

69 (Ventana-emergente - Popup)

In vitro fertilización/ gameto intrafalopiana transfer.

70 (Ventana-emergente - Popup)

Excepto por ácidos oxidantes. Para ácidos oxidantes, ver "Agentes Oxidantes Fuertes" Oxidizing agents, strong.

71 (Ventana-emergente - Popup)

Excepto para las mangueras de cloruro polivinílico, las cuales resisten temperaturas de 121°C y pueden ser sometidas al autoclave. Consulte "El Uso y Cuidado del Material de Plástico del Laboratorio" ("The Use and Care of Plastic Labware") en el *Catálogo vigente de Nalgene Labware* para información detallada sobre esterilización.

72 (Ventana-emergente - Popup)

Esterilización: Autoclave: Limpie y enjuague el utensilio con agua destilada antes de meterlo al autoclave. Ciertas sustancias químicas que no tienen apreciable efecto en las resinas a temperatura ambiente pueden causar deterioro a temperaturas de autoclave a menos que se remuevan previamente con agua destilada. *Gas*: Óxido de etilo. *Calor en seco*: A 160°C . *Químico*: Cloruro de Benzalconio, formalina, etanol, y así sucesivamente.

73 (Ventana-emergente - Popup)

La esterilización reduce la fuerza mecánica. No usar envases de policarbonato para aplicaciones de vacío si estos han sido sometidos al autoclave.

74 (Ventana-emergente - Popup)

Excepto para las mangueras de cloruro polivinílico, las cuales resisten temperaturas de 121°C y pueden ser sometidas al autoclave. Consulte "El Uso y Cuidado del Material de Plástico del Laboratorio" ("The Use and Care of Plastic Labware") en el *Catálogo vigente de Nalgene Labware* para información detallada sobre esterilización.

75 (Ventana-emergente - Popup)

La esterilización reduce la fuerza mecánica. No usar envases de policarbonato para aplicaciones de vacío si estos han sido sometidos al autoclave.

76 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Arendt, J, Minors, DS, and Waterhouse, JM (eds):

Biological rhythms in clinical practice. Boston, Wright, 1989.

77 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

2531



Liskowsky, DR:

Biological rhythms and shift work. *JAMA* 268:3047, 1992.

78 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Utiger RD:

Melatonin - the hormone of darkness. *N Engl J Med* 327:1377-1379, 1992.

79 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Fevre-Montage, M, Van Cauter, E, Refetoff, S, Deshir, D, Tourniaire, J, and Copinschi, G:

Effects of "jet lag" on hormonal patterns. II. Adaptation of melatonin circadian periodicity. *J Clin Endocrinol Metab* 52:642-649, 1978.

80 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Tietz, NW:

Clinical guide to laboratory tests, 2nd edition. Philadelphia, WB Saunders, 1990.

81 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Benvenuti, M, Legnaioli, M, Melone, F, Taddei, I, and Tarquini, B: Circadian rhythm in prostatic acid phosphatase (PAP): a potential tumor marker rhythm in prostatic cancer (PCa). *Chronobiologia* 10: 383, 1983.

82 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Kemp, GJ, Blumsohn, A, and Morris, BW:

Circadian changes in plasma phosphate concentration, urinary phosphate excretion, and cellular phosphate shifts. *Clin Chem* 38:400-402, 1992.

83 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Dufour, DR:

Reference values in endocrinology. in Becker, KL (*ibid*), 1723-1761.

84 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Rosen, JF, and Chesney, RW:

Circulating calcitriol concentrations in health and disease. *J Pediatr* 103:1-17, 1983.

85 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Elomaa, I, Karonen, S-L, Karianto, A-L, and Pelkonen, R: Seasonal variation of urinary calcium and oxalate excretion, serum 25(OH)D3, and albumin level in relation to renal stone formation. *Scand J Urol Nephrol* 16:152-161, 1982.

86 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Harrup, JS, Ashwell K, and Hopton MR:

Circannual and within-individual variation of thyroid function tests in normal subjects. *Ann Clin Biochem* 22 (Pt 4):371-375, 1985.

87 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Fraser, CG:

Biological variation in clinical chemistry - an update: collated data, 1988-1991. *Arch Pathol Lab Med* 116:916-923, 1992.

88 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Statland, BE, Winkel, P, and Bokelund, H:

Factors contributing to intra-individual variation of serum constituents: 2. effects of exercise and diet on variation of serum constituents in healthy subjects. *Clin Chem* 19:1380-1383, 1973.

89 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Stansbie, D, and Bedley, JP:



Biochemical consequences of exercise. *JIFCC* 3:87-91, 1991.

90 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Ronkainen, H:

Depressed follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, and prolactin responses to luteinizing hormone-releasing hormone-releasing hormone, thyrotropin-releasing hormone, and metoclopramide test in endurance runners in the hard training season. *Fertil Steril* 44:755-759, 1985.

91 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Statland, BE, Winkel, P, and Bokelund, H:

Factors contributing to intra-individual variation of serum constituents: 2. effects of exercise and diet on variation of serum constituents in healthy subjects. *Clin Chem* 19:1380-1383, 1973.

92 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Ahlquist, DA, McGill, DB, Schwartz, S, Taylor, WF, Ellefson, M, and Owen, RA:

HemoQuant, a new quantitative assay for fecal hemoglobin. Comparison with Hemocult. *Ann Intern Med* 101:297-302, 1984.

93 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Perrone, RD, Madias, NE, and Levey, AS:

Serum creatinine as an index of renal function: new insights into old concepts. *Clin Chem* 38:1933-1953, 1992.

94 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Muldoon, MF, Bachen, EA, Mannuck, SB, Waldstein, SR, Bricker, PL, and Bennett, JA:

Acute cholesterol responses to mental stress and change in posture. *Arch Intern Med* 152:775-780, 1992.

95 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Genest, JJ, McNamara, JR, Ordovas, JM, et al:

Effect of elective hospitalization on plasma lipoprotein cholesterol and apolipoproteins AI, B, and LP(a). *Am J Cardiol* 65:677-679, 1990.

96 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Gore, JM, Goldberg RJ, Matsumoto AS, et al:

Validity of serum total cholesterol level obtained within 24 hours of acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 54:722-725, 1984.

97 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Gebhart, SP, Watts, NB, Clark, RV, Umpierrez, G, and Sgoutas, D:

Reversible impairment of gonadotropin secretion in critical illness. Observations in postmenopausal women. *Arch Intern Med* 149:1637-1641, 1989.

Kaptein, EM, Grieb, DA, Spencer, CA, Wheeler, WS, and Nicoloff, JT: Thyroxine metabolism in the low thyroxine state of critical nonthyroidal illnesses. *J Clin Endocrinol Metab* 53:764-771, 1981.

98 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Davenport, MW, and Zipser, RD:

Association of hypotension with hyperreninemic hypoaldosteronism in the critically ill patient. *Arch Intern Med* 143:735-737, 1983.

99 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Statland, BE, Bokelund, H, and Winkel, P:

Factors contributing to intra-individual variation of serum constituents: 4. effects of



posture and tourniquet application on variation of serum constituents in healthy subjects. *Clin Chem* 20:1513-1519, 1974.

100 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Van Cauter, E: Endocrine rhythms. in Becker, KL (ed): *Principles and practice of endocrinology*. Philadelphia, JB Lippincott, 1990, 45-52.

101 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

National Committee for Clinical Laboratory Standards:

Approved standard procedures for the collection of diagnostic blood specimens by skin puncture. Villanova, Pa, 1982.

College of American Pathologists:

So you're going to collect a blood specimen, 5th Ed. Danville, IL, Interstate Printers, 1992.

Pendergraph, GA:

Handbook of phlebotomy, 2nd ed. Philadelphia, Lea and Febiger, 1988.

102 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Hill, BM, Laessig, RH, Koch, DD, and Hassemer, DJ:

Comparison of plastic vs. glass evacuated serum-separator (SST) blood-drawing tubes for common clinical chemistry determinations. *Clin Chem* 38:1474-1478, 1992.

103 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Adroque, HJ, Rashad, MN, Gorin, AB, Yacoub, J, and Madias, NE: Assessing acid-base status in circulatory failure. Differences between arterial and central venous blood. *N Engl J Med* 320:1312-1316, 1989.

104 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Atkin, S, Dasmahapatra, A, Jaker, MA, et al:

Fingerstick glucose determination in shock. *Ann Intern Med* 114:1020-1024, 1991.

105 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Irjala, K, Koskinen, P, Nanto, V, and Peltola, O: Interpretation of oral glucose tolerance test: capillary-venous difference in blood glucose and the effect of analytical method. *Scand J Clin Lab Invest* 46:307-313, 1986.

106 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Doumas, BT, Hause, LL, Simuncak, DM, and Breitenfeld, D: Differences between values for plasma and serum in tests performed in the Ektachem 700 XR analyzer, and evaluation of "plasma separator tubes (PST)". *Clin Chem* 35:151-153, 1989.

107 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Don, BR, Sebastian, A, Cheitlin, M, Christiansen, M, and Schambelan, M: Pseudohyperkalemia caused by fist clenching during phlebotomy. *N Engl J Med* 322:1290-1292, 1990.

108 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

National Institute on Drug Abuse:

Urinalysis collection handbook for federal drug testing programs. Washington, US Department of Health and Human Services, 1988.

109 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Weilert, M, Tilzer, LL:

Putting bar codes to work for improved patient care. *Clin Lab Med* 11:227-238, 1991.

110 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Sazama K, Robertson, EA, and Chesler, RA:



Is routine antiglycolysis required for routine glucose analysis? *Clin Chem* 25: 1086-1087, 1979.

111 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Sealey, JE:

Plasma renin activity and plasma prorenin assays. *Clin Chem* 37:1811-1819, 1991.

112 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Howanitz, PJ, Steindel, SJ, Cembrowski, GS, and Long, TA: Emergency department stat test turnaround times. A College of American Pathologists' Q-probes study for potassium and hemoglobin. *Arch Pathol Lab Med* 116:122-128, 1992.

113 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Howanitz, PJ, Steindel, SJ, Cembrowski, GS, and Long, TA: Emergency department stat test turnaround times. A College of American Pathologists' Q-probes study for potassium and hemoglobin. *Arch Pathol Lab Med* 116:122-128, 1992.

Graber, M, Subramani, K, Corish, D, and Schwab, A: Thrombocytosis elevates serum potassium. *Am J Kidney Dis* 12:116-120, 1988.

114 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Ringelhann, B, Laszlo, E, and Vajda, L:

Pseudohyperkalaemia in acute myeloid leukemia. *Lancet* 1:928, 1974.

115 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Dufour, DR, Mesonero, C, and Miller, K: Artifactual hyperkalemia induced by heparin in patients with extreme leukocytosis. *Clin Chem* 33:914, 1987.

116 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Hortin, G, Cole, TG, Gibson, DW, and Kessler, G: Decreased stability of triglycerides and increased free glycerol in serum from heparin-treated patients. *Clin Chem* 34:1847-1849, 1988.

117 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Pickering, LK, and Rutherford, I:

Effect of concentration and time upon inactivation of tobramycin, gentamicin, netilmicin, and amikacin by azlocillin, carbenicillin, mecillinam, mezlocillin and piperacillin. *J Pharmacol Exp Ther* 217:345-349, 1981.

118 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Burtis, CA:

The effects of temperature and evaporation on analytical error in the clinical laboratory. *Clinical Lab Ann* 1:1-35, 1982.

119 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

DiMagno, EP, Corle, D, O'Brien, JF, Masnyk, IJ, Go, VLW, and Aamodt, R:

Effect of long-term freezer storage, thawing, and refreezing on selected constituents of serum. *Mayo Clin Proc* 64:1226-1234, 1989.

120 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Arendt, J, Minors, DS, and Waterhouse, JM (eds):

Biological rhythms in clinical practice. Boston, Wright, 1989.

121 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Howey, JEA, Browning, MCK, and Fraser, CG:

Selecting the optimum specimen for assessing slight albuminuria, and a strategy for clinical investigation: novel uses of data on biological variation. *Clin Chem* 33:2034-2038, 1987.

122 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)



Clerico, A, Giammattei, C, Cecchini, L, et al: Exercise-induced proteinuria in well-trained athletes. *Clin Chem* 36:562-564, 1990.

123 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Yoneyama, K, Ishigure, S, Ikeda, J, and Nagata, H:

The day to day variations of urinary hydroxyproline and creatinine excretions, and dietary protein intake. *Nippon Eiseigaku Zasshi* 39:587-594, 1984.

124 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Perrone, RD, Madias, NE, and Levey, AS:

Serum creatinine as an index of renal function: new insights into old concepts. *Clin Chem* 38:1933-1953, 1992..

125 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Ginsberg JM, Chang BS, Matarese RE, and Garella, S:

Use of single voided urine samples to estimate quantitative proteinuria. *N Engl J Med* 309:1543-1546, 1983.

Huikeshoven, FJM, and Zuiderhoudt, FMJ:

Hypocalciuria in hypertensive disorder in pregnancy and how to measure it. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 36:81-85, 1990.

126 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Buist, NRM:

Laboratory aspects of newborn screening for metabolic disorders. *Lab Med* 19:145-150, 1988.

127 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Ladenson, JH:

Patients as their own controls: use of the computer to identify "laboratory error". *Clin Chem* 21:1648-1653, 1975.

128 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Sher, PP:

An evaluation of the detection capacity of a computer-assisted real-time delta check system. *Clin Chem* 25:870-872, 1979.

129 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Lacher, DA, and Connelly, DP:

Rate and delta checks compared for selected chemistry tests. *Clin Chem* 34:1966-1970, 1988.

130 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Lacher, DA:

Relationship between delta checks for selected chemistry tests. *Clin Chem* 36:2134-2136, 1990.

131 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Shapiro, BA, Harrison, RA, Cane, RD, and Kozlowski-Templin, R: Clinical application of blood gases, 4th ed. Chicago, Year Book Medical Publishers, 1989, 274-275.

132 (Ventana-emergente - Popup)

Rosen, JF, and Chesney, RW:

Circulating calcitriol concentrations in health and disease. *J Pediatr* 103:1-17, 1983.

Fraser, CG:

The application of theoretical goals based on biological variation data in proficiency



testing. *Arch Pathol Lab Med* 112:404-415, 1988.

Statland, BE, Winkel, P, and Bokelund, H:

Factors contributing to intra-individual variation of serum constituents: 2. effects of exercise and diet on variation of serum constituents in healthy subjects. *Clin Chem* 19:1380-1383, 1973.

133 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Richards WG, Scott RR:

Structure and spectra of molecules, New York, 1985, Wiley & Sons.

Clayton RK:

Light and living matter: the physical part, New York, 1970, McGraw-Hill.

Jaffe HH, Orchin M:

Theory and applications of ultraviolet spectroscopy, New York, 1966, Wiley & Sons.

134 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Willard HH, Merritt LL, Dean JA: *Instrumental methods of analysis*, ed 4, Princeton, N.J., 1965, Van Nostrand.

135 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Willard HH, Merritt LL, Dean JA:

Instrumental methods of analysis, ed 4, Princeton, N.J., 1965, Van Nostrand.

Frings CS, Broussard LA:

Calibration and monitoring of spectrometers and spectrophotometers, *Clin Chem* 25:1013-1017, 1979.

Brewer JM, Pesce AJ, Ashworth RB, editors:

Experimental techniques in biochemistry, Englewood Cliffs, N.J., 1974, Prentice-Hall.

Keller H:

Optical methods of measurement. In Richterich R, Colombo JP, editors: *Clinical chemistry*, New York, 1981, Wiley & Sons.

Ward KM, Harris E:

Spectrophotometry. In Ward KM, Lehmann CA, Leiken AM, editors: *Clinical laboratory instrumentation and automation: principles, application, and selection*, Philadelphia, 1994, Saunders.

Narayanan S:

Principles and applications of laboratory instrumentation, Chicago, 1989, ASCP Press, pp 8-17.

Khazanie P:

Spectrophotometry. In Anderson SC, Cockagne S, editors: *Clinical chemistry: concepts and applications*, Philadelphia, 1993, Saunders.

Federal Register 57(4):7164-7165, 1992.

136 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Instrumentation Guidelines Study Group, Subcommittee on Enzymes: *Clin Chem* 23:2160-2162, 1977.

137 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Alexander LR, Barnhart ER:

Photometric quality assurance instrument check procedures, Atlanta, Ga., 1980, U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control, Bureau of Laboratories.

138 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Frings CS, Broussard LA:

Calibration and monitoring of spectrometers and spectrophotometers, *Clin Chem*



25:1013-1017, 1979.

139 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Alexander LR, Barnhart ER:

Photometric quality assurance instrument check procedures, Atlanta, Ga., 1980, U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control, Bureau of Laboratories.

140 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Curme HG, Columbus RL, Dappen GM, et al:

Multilayer film elements for clinical analysis: general concepts, *Clin Chem* 24:1335-1342, 1978.

141 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Rubeska I:

Atomic absorption spectroscopy, Cleveland, 1969, Chemical Rubber Co. Press.

Robinson JW:

Atomic absorption spectroscopy, ed 2, New York, 1973, Marcel Dekker.

142 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Winefordner JD, editor:

Spectrochemical methods of analysis, New York, 1977, John Wiley & Sons, Inc, Wiley Interscience.

Dvorak J, Rubeska I, Rezak Z:

Flame photometry: laboratory practice, Cleveland, 1971, Chemical Rubber Co. Press.

143 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Dvorak J, Rubeska I, Rezak Z:

Flame photometry: laboratory practice, Cleveland, 1971, Chemical Rubber Co. Press.

144 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Simonson MG:

The application of a photon-counting fluorometer for the immunofluorescent measurement of therapeutic drugs. In Kaplan LA, Pesce AJ, editors: *Nonisotopic alternatives to radioimmunoassay*, New York, 1981, Marcel Dekker.

Pesce AJ, Rosen CG, Pasby TL, editors:

Fluorescence spectroscopy, New York, 1971, Marcel Dekker.

Wehry FL, editor:

Modern fluorescence spectroscopy, New York, 1976, Plenum Press.

145 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Hemmiléda I:

Fluoroimmunoassays and immunofluorometric assays, *Clin Chem* 31:359-370, 1985.

146 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Hemmiléda I:

Fluoroimmunoassays and immunofluorometric assays, *Clin Chem* 31:359-370, 1985.
Enhanced luminescence: a practical immunoassay system, Medicine Publishing Foundation Symposium Series 18, Oxford, 1986, Medicine Publishing Foundation, pp 1-56.

Scholmerich J et al, editors:

Bioluminescence and chemiluminescence: new perspectives, Chichester, 1987, Wiley & Sons.

147 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Pesce AJ, Rosen CG, Pasby TL, editors:

Fluorescence spectroscopy, New York, 1971, Marcel Dekker.

Spencer RD:

Fluorescence polarization. In Kaplan LA, Pesce AJ, editors: *Nonisotopic alternatives to*



radioimmunoassay, New York, 1981, Marcel Dekker.

Jolly MD, Stroupe SD, Wang CJ, et al:

Fluorescence polarization immunoassay. I. Monitoring aminoglycoside antibiotics in serum and plasma, *Clin Chem* 27:1190-1197, 1981.

148 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Ritchie RF, editor:

Automated immunoanalysis, parts 1 and 2, New York, 1978, Marcel Dekker.

Deverill I, Reeves WG:

Light scattering and absorption developments in immunology, *J Immunol Methods* 38:191-204, 1980.

Gauldie J:

Principles and clinical applications of nephelometry. In Kaplan LA, Pesce AJ, editors: *Nonisotopic alternatives to radioimmunoassay*, New York, 1981, Marcel Dekker.

149 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Ritchie RF, editor:

Automated immunoanalysis, parts 1 and 2, New York, 1978, Marcel Dekker.

150 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Kusnetz J, Mansberg HP:

In Ritchie RF: *Automated immunoanalysis, part 1*, New York, 1978, Marcel Dekker.

151 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Gauldie J:

Principles and clinical applications of nephelometry. In Kaplan LA, Pesce AJ, editors: *Nonisotopic alternatives to radioimmunoassay*, New York, 1981, Marcel Dekker.

152 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Glover FA, Gaulden JDS:

Relationship between refractive index and concentration of solutions, *Nature* 200:1165-1166, 1963.

153 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Anderson DJ, Van Lente F, Apple FS, et al:

Clinical chemistry, *Anal Chem* 63:165R-270R, 1991.

Eiceman GA, Clement RE, Hill HH Jr:

Gas chromatography, *Anal Chem* 64:170R-180R, 1992.

Dorsey JG, Foley JB, Cooper WWT, et al:

Liquid chromatography: theory and methodology, *Anal Chem* 64:353R-389R, 1992.

Sherma J:

Planar chromatography, *Anal Chem* 64:134R-147R, 1992.

154 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Tswett MS:

Chromatographic absorption analysis: selected works. In Berezken VG, compiler; Masson MR, translation editor: *Ellis Horwood Series in Analytical Chemistry*, New York, 1990, E. Horwood Publishing.

155 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Giddings JC:

Reduced plate height equation: a common link between chromatographic methods, *J Chromatogr* 13:301-304, 1964.

156 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Heftman E:

History of chromatography. In Heftman E, editor: *Chromatography: fundamentals and applications of chromatography and related differential migration methods*, ed 5, *Journal of Chromatography Library*, vol 51Aa, New York, 1992, Elsevier Science Publishers.

Strain HH, Svec WA:

Differential methods of analysis. In Heftman E, editor: *Chromatography: a laboratory handbook* 2539



of chromatography methods, ed 3, New York, 1975, Van Nostrand Reinhold Co.

Kalasz H, Ettre LS:

Chromatography: the state of the art, Wellingborough, U.K., 1984, Collets.

Schoenmakers OJ: *Optimization of chromatographic selectivity: a guide to method development*, New York, 1986, Elsevier.

Sherma J, Fried B, editors:

Thin layer chromatography, Chromatographic Science Series, vol 55, New York, 1990, Marcel Dekker.

157 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Anderson DJ, Van Lente F, Apple FS, et al:

Clinical chemistry, *Anal Chem* 63:165R-270R, 1991.

Eiceman GA, Clement RE, Hill HH Jr:

Gas chromatography, *Anal Chem* 64:170R-180R, 1992.

Dorsey JG, Foley JB, Cooper WWT, et al:

Liquid chromatography: theory and methodology, *Anal Chem* 64:353R-389R, 1992.

Sherma J:

Planar chromatography, *Anal Chem* 64:134R-147R, 1992.

Tswett MS:

Chromatographic absorption analysis: selected works. In Berezken VG, compiler; Masson MR, translation editor: *Ellis Horwood Series in Analytical Chemistry*, New York, 1990, E. Horwood Publishing.

Ettre LS:

The development of chromatography, *Anal Chem* 43:20A-21A, 25A, 27A-31A, 1971.

158 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Wong HY:

Therapeutic drug monitoring and toxicology, Chromatographic Science Series, vol 32, New York, 1985, Marcel Dekker.

159 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Schoenmakers OJ:

Optimization of chromatographic selectivity: a guide to method development, New York, 1986, Elsevier.

Snyder LR, Glajch JL, Kirkland JJ:

Practical HPLC method development, New York, 1988, Wiley & Sons.

160 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Snyder LR:

A rapid approach to selecting the best experimental conditions for high speed liquid column chromatography.

1. Estimating initial sample resolution and the final resolution required by a given problem, *J Chromatogr Sci* 10:200-212, 1972.

161 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Katz E:

Quantitative analysis using chromatographic techniques, New York, 1987, Wiley & Sons.

162 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Giddings JC:

Non-equilibrium and diffusion: a common basis for theories of chromatography, *J*

Chromatogr 2:44-52, 1959.

Snyder LR, Kirkland JJ:

Introduction of modern liquid chromatography, ed 2, New York, 1979, Wiley & Sons.

163 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Martin AJP, Synge RLM:

A new form of chromatogram employing two liquid phases. I. A theory of chromatography. II. Application to the micro-determinations of the higher monoaminoacids in proteins, *Biochem J* 35:1358-1368, 1941.

164 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)



Van Deemter JJ, Zuiderweg FJ, Klinkenberg A:

Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography, *Chem Engl Sci* 5:271-289, 1956.

165 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Schoenmakers OJ:

Optimization of chromatographic selectivity: a guide to method development, New York, 1986, Elsevier.

166 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Schoenmakers OJ:

Optimization of chromatographic selectivity: a guide to method development, New York, 1986, Elsevier.

167 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Grob RL:

Modern practice of gas chromatography, ed 2, New York, 1985, Wiley & Sons.

Rotzsche H:

Stationary phases in gas chromatography, *Journal of Chromatography Library*, vol 48, New York, 1991, Elsevier Science Publishers.

168 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Knapp DR:

Handbook of analytical derivatization reactions, New York, 1979, Wiley & Sons.

169 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

McMahon DH:

Methods development guidelines for chemical derivatization in gas chromatography, *J Chromatogr Sci* 23:426-428, 1985.

170 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Snyder LR, Kirkland JJ:

Introduction of modern liquid chromatography, ed 2, New York, 1979, Wiley & Sons.

Van Deemter JJ, Zuiderweg FJ, Klinkenberg A:

Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography, *Chem Engl Sci* 5:271-289, 1956.

Lawrence JF:

Advantages and limitations of chemical derivatization for trace analysis by liquid chromatography, *J Chromatogr Sci* 23:484-487, 1985.

171 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Lingeman H, Underberg WJM, editors:

Detection-oriented derivatization techniques in liquid chromatography, *Chromatographic Science Series*, vol 48, New York, 1990, Marcel Dekker.

172 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

West SD:

The prediction of reversed-phase HPLC retention indices and resolution as a function of solvent strength and selectivity, *J Chromatogr Sci* 25:122-129, 1987.

173 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Snyder LR, Glajch JL, Kirkland JJ:

Practical HPLC method development, New York, 1988, Wiley & Sons.

Keller RA, Snyder LR:

Relation between the solubility parameter and the liquid-solid solvent strength parameter, *J Chromatogr Sci* 9:345-459, 1971.

Karger BL, Snyder LR, Eon C:

An expanded solubility parameter treatment for classification and use of chromatographic solvents and absorbents: parameters for dispersion, dipole, and hydrogen bonding interactions, *J Chromatogr* 125:71-88,



1976.

174 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Snyder LR:

Solvent selection for separation processes. In Perry ES, Weissberger A, editors: *Techniques of chemistry: separation and purification*, ed 3, vol 12, New York, 1978, Wiley & Sons.

175 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Snyder LR, Kirkland JJ:

Introduction of modern liquid chromatography, ed 2, New York, 1979, Wiley & Sons.

Keller RA, Snyder LR:

Relation between the solubility parameter and the liquid-solid solvent strength parameter, *J Chromatogr Sci* 9:345-459, 1971.

Karger BL, Snyder LR, Eon C:

An expanded solubility parameter treatment for classification and use of chromatographic solvents and absorbents: parameters for dispersion, dipole, and hydrogen bonding interactions, *J Chromatogr* 125:71-88, 1976.

176 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Keller RA, Snyder LR:

Relation between the solubility parameter and the liquid-solid solvent strength parameter, *J Chromatogr Sci* 9:345-459, 1971.

Karger BL, Snyder LR, Eon C:

An expanded solubility parameter treatment for classification and use of chromatographic solvents and absorbents: parameters for dispersion, dipole, and hydrogen bonding interactions, *J Chromatogr* 125:71-88, 1976.

Snyder LR:

Solvent selection for separation processes. In Perry ES, Weissberger A, editors: *Techniques of chemistry: separation and purification*, ed 3, vol 12, New York, 1978, Wiley & Sons.

Glajch JL, Kirkland JJ, Squire KM, Minor JM:

Optimization of solvent strength and selectivity for reverse-phase liquid chromatography using an interactive mixture-design statistical technique. *J Chromatogr* 199:57-59, 1980.

Snyder LR:

Classification of the solvent properties of common liquids, *J Chromatogr* 92:223-230, 1974.

Hildebrand JH, Scott RI:

The solubility of non-electrolytes, ed 3, New York, 1964, Dover Publications; and Hildebrand JH, Scott RI: Regular solutions, Englewood Cliffs, N.J., 1962, Prentice-Hall.

177 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Hildebrand JH, Scott RI:

The solubility of non-electrolytes, ed 3, New York, 1964, Dover Publications; and Hildebrand JH, Scott RI: Regular solutions, Englewood Cliffs, N.J., 1962, Prentice-Hall.

178 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Snyder LR:

Classification of the solvent properties of common liquids, *J Chromatogr* 92:223-230, 1974.

179 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Trappe W:

Die Trennung von biologischen Fettstoffen aus ihren natürlichen Gemischen durch Anwendung von Adsorptionsäulen. 1. Mitteilung: Die elutrope Reihe der Lösungsmittel, *Biochem Z* 305:150-161, 1940.

180 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Keller RA, Snyder LR:

Relation between the solubility parameter and the liquid-solid solvent strength parameter, *J Chromatogr Sci* 9:345-459, 1971.



Karger BL, Snyder LR, Eon C:

An expanded solubility parameter treatment for classification and use of chromatographic solvents and absorbents: parameters for dispersion, dipole, and hydrogen bonding interactions, *J Chromatogr* 125:71-88, 1976.

181 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Snyder LR, Kirkland JJ:

Introduction of modern liquid chromatography, ed 2, New York, 1979, Wiley & Sons.

Karger BL, Snyder LR, Eon C:

An expanded solubility parameter treatment for classification and use of chromatographic solvents and absorbents: parameters for dispersion, dipole, and hydrogen bonding interactions, *J Chromatogr* 125:71-88, 1976.

182 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Rohrschneider L:

Eine Methode zur Charakterisierung von gaschromatographischen Trennflüssigkeiten, *J Chromatogr* 22:6-22, 1966.

183 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

McReynolds WO:

Characterization of some liquid phases, *J Chromatogr Sci* 8:685-691, 1970.

184 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Grob RL:

Modern practice of gas chromatography, ed 2, New York, 1985, Wiley & Sons.

185 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Snyder LR, Kirkland JJ:

Introduction of modern liquid chromatography, ed 2, New York, 1979, Wiley & Sons.

186 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Sherma J, Fried B, editors:

Thin layer chromatography, Chromatographic Science Series, vol 55, New York, 1990, Marcel Dekker.

Zlatkin A, Kaiser RE:

HPTLC: *high performance thin-layer chromatography*, Journal of Chromatography Library Series 9, New York, 1977, Elsevier Scientific Publishing.

Touchstone JC:

Practice of thin layer chromatography, ed 3, New York, 1992, Wiley & Sons.

187 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Halasz I, Sebastian I:

New stationary phase for chromatography, *Angew Chem, Int Ed* 8:453-454, 1969.

188 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Anderson DMW:

Gel permeation chromatography. In Simpson CF, editor: *Practical high performance liquid chromatography*, Philadelphia, 1978, Heyden & Sons.

189 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Tabor MW:

Chemical analysis for assessment and evaluation of environmental pollutants: fact or artifact, *Environ Sci Res* 38:205-214, 1990.

190 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Smith CC, Khalil A, Tabor MW:

Fractionation of urinary and fecal metabolites of the antimalarial drug WR-158,122 following oral doses in rats and rhesus monkey, *Toxicologist* 3:52, 1983.

191 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Que Hee SS, Ward JA, Tabor MW, Suskind RR:

Screening method for Aroclor 1254 in whole blood, *Anal Chem* 55:157-160, 1983.

192 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Stolman A, Pranitis PA:

XAD-2 resin drug extraction methods for biologic samples, *Clin Toxicol* 10:49-60, 1977.

193 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Weissman N, Lowe ML, Beattie JM, Demetriou JA:

Screening method for detection of drugs of abuse in human urine, *Clin Chem* 17:875-881, 1971.

194 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Shackleton CHL, Whitney JD:

Use of Sep-Pak cartridges for urinary steroid extraction: evaluation of the method for use prior to gas chromatographic analysis, *Clin Chim Acta* 107:231-243, 1980.

Heikkinen R, Fotsis T, Adlercreutz H:

Reversed-phase C18 cartridge for extraction of estrogens from urine and plasma, *Clin Chem* 27:1186-1189, 1981.

195 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Tabor MW, Loper JC:

Analytical isolation, separation and identification of mutagens from nonvolatile organics of drinking water, *Int J Environ Anal Chem* 19:281-318, 1985.

196 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Horning EC, Horning MG:

Metabolic profiles: gas-phase methods for analysis of metabolites, *Clin Chem* 17:802-809, 1971.

197 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Riddick JA, Bunger WB:

Organic solvents. In Weissberger A, editor: *Techniques of chemistry*, vol 2, ed 3, New York, 1978, Wiley & Sons.

198 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

DeZeeuw RA, Jonkman JHG, van Mansvelt FJW:

Plasticizers as contaminants in high purity solvents: a potential source of interference in biological analysis, *Anal Biochem* 67:339-341, 1975.

199 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Denney DW, Karsek FW:

Detection and identification of contaminants from foil-lined screw-cap sample vials, *J Chromatogr* 151:75-80, 1978.

200 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Hopgood MF:

Nomogram for calculating percentage ionization of acids and bases, *J Chromatogr* 47:45-50, 1970.

201 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Constable DJC, Smith SR, Tanaka J:

Comparison of solvent reduction methods for concentration of polycyclic aromatic hydrocarbon solutions, *Environ Sci Technol* 18:975-978, 1984.

202 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Kossa WC, MacGee J, Ramachandran S, Webber AJ:

Pyrolytic methylation/gas chromatography: a short review, *J Chromatogr Sci* 17:177-187, 1979.

203 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Ko H, Petzold EN:

Isolation of samples prior to chromatography. In Tsuji K, Morozowich W, editors: *GLC and HPLC determination of therapeutic agents, part 1*, New York, 1978, Marcel Dekker.



204 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Sunshine I:

Manual of analytical toxicology, Boca Raton, Fla, 1971, CRC Press, Inc.

205 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Snyder LR, Kirkland JJ:

Introduction to modern liquid chromatography, ed 2, New York, 1979, Wiley & Sons.

206 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Scott RPW:

Liquid chromatography column theory, Chichester, 1992, Wiley & Sons.

207 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Scott RPW:

Liquid chromatography column theory, Chichester, 1992, Wiley & Sons.

Karger BL, Snyder LR, Horvath C:

An introduction to separation science, New York, 1973, Wiley & Sons.

Giddings JC:

Dynamics of chromatography, New York, 1965, Marcel Dekker.

208 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Guichon GG:

In Horvath C, editor: *High performance liquid chromatography: advances and perspectives*, vol 2, New York, 1981, Academic Press.

209 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Guichon GG:

In Horvath C, editor: *High performance liquid chromatography: advances and perspectives*, vol 2, New York, 1981, Academic Press.

210 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Snyder LR, Kirkland JJ:

Introduction to modern liquid chromatography, ed 2, New York, 1979, Wiley & Sons.

211 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

van der Wal SJ, Snyder LR:

Precision of 'high-performance' liquid-chromatographic assays with sample pretreatment: error analysis for the Technicon 'Fast-LC' system, *Clin Chem* 27:1233-1240, 1981.

212 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Snyder LR, Glajch JL, Kirkland JJ:

Theoretical basis for a systematic optimization of mobile phase selectivity in liquid-solid chromatography, *J Chromatogr* 218:299-326, 1981.

213 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Majors RE:

Trends in HPLC column usage, *LCGC* 9:686-693, 1991.

214 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Dorsey JG, Dill KA:

The molecular mechanism of retention in reversed-phase liquid chromatography, *Chem Rev* 89:331-346, 1989.

Szepesi G:

How to use reverse-phase HPLC, New York, 1992, VCH.

215 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Karger BL, LePage JN, Tanaka N:

Secondary chemical equilibria in high-performance liquid chromatography. In Horvath C, editor: *High* 2545



performance liquid chromatography: advances and perspectives, vol 1, New York, 1980, Academic Press.

216 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Szepesi G:

How to use reverse-phase HPLC, New York, 1992, VCH.

217 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Turkova J:

Bioaffinity chromatography, ed 2, Amsterdam, 1993, Elsevier.

Scouten WH:

Affinity chromatography: bioselective adsorption on inert matrices, St. Louis, 1992, Sigma- Aldrich Co.

218 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Allenmark S:

Chromatographic enantioseparation: methods and applications, ed 2, New York, 1991, Ellis Horwood.

Krstulovic AM:

Chiral separations by HPLC, Chichester, 1989, Ellis Horwood.

219 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Unger KK, editor:

Packings and stationary phases in chromatographic analysis, New York, 1990, Marcel Dekker.

220 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Anderson DJ:

High-performance liquid chromatography (advances in packing materials), *Anal Chem* 67:475R-486R, 1995.

221 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Mikes O, Coupek J:

Organic supports. In Gooding KM, Regnier FE, editors: *HPLC of biological macromolecules*, New York, 1990, Marcel Dekker, pp 25-46.

Tanaka N, Araki M:

Polymer-based packing materials for reversed-phase chromatography, *Adv Chromatogr* 30:81-122, 1989.

222 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Anderson DJ:

High-performance liquid chromatography (direct injection techniques), *Anal Chem* 65:434R-443R, 1993.

223 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Afeyan NB, Fulton SP, Regnier FE:

Perfusion chromatography packing materials, *J Chromatogr* 544:267- 279, 1991.

224 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Dolan JW, Snyder LR:

Troubleshooting LC systems: a comprehensive approach to troubleshooting LC equipment and separations, Clifton, N.J., 1989, Humana Press.

225 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Dolan J, Upchurch P:

Interchangeability of HPLC fittings, Oak Harbor, Wash., 1983, Upchurch Scientific; also *LC* 2:20-21, 1984, and 3:92-95, 1985.

226 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Parriott D, editor:

A practical guide to HPLC detection, San Diego, 1993, Academic Press.

Yeung ES, editor:

Detectors for liquid chromatography, New York, 1986, Wiley & Sons.

227 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Lingeman H, Underberg WJM, editors:

Detection-oriented derivatization techniques in liquid chromatography, New York, 1990, Marcel Dekker.



228 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Parriott D, editor:

A practical guide to HPLC detection, San Diego, 1993, Academic Press.

229 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Anderson DJ:

High-performance liquid chromatography, *Anal Chem* 63:213R-219R, 262R-264R, 1991.

230 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Johnson DC, LaCourse WR:

Liquid chromatography with pulsed electrochemical detection at gold and platinum electrodes, *Anal Chem* 62:589A-597A, 1990.

231 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Anderson DJ:

High-performance liquid chromatography, *Anal Chem* 63:213R-219R, 262R-264R, 1991.

Niessen WMA, van der Greef J:

Liquid chromatography-mass spectrometry: principles and applications, New York, 1992, Marcel Dekker.

232 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Heftmann E, editor:

Chromatography: fundamentals and applications of chromatography and related differential migration methods, part B: Applications, ed 5, Amsterdam, 1992, Elsevier.

Hanai T, editor:

Liquid chromatography in biomedical analysis, Amsterdam, 1991, Elsevier.

Papadoyannis In:

HPLC in clinical chemistry, New York, 1990, Marcel Dekker.

Hearn MTW, editor:

HPLC of proteins, peptides and polynucleotides, contemporary topics and applications, New York, 1991, VCH.

Gooding KM, Regnier FE, editors:

HPLC of biological macromolecules, New York, 1990, Marcel Dekker.

Fallon A, Booth RFG, Bell LD, editors:

Applications of HPLC in biochemistry, Amsterdam, 1987, Elsevier.

Lim CK, editor:

HPLC of small molecules, Oxford, U.K., 1986, IRL Press (Oxford University Press).

Henschen A, Hupe KP, Lottspeich F, Voelter W, editors:

High performance liquid chromatography in biochemistry, Weinheim, Federal Republic of Germany, 1985, VCH.

233 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Willett J, Kealey D:

Gas chromatography, New York, 1987, Wiley & Sons.

Grob RL:

Modern practice of gas chromatography, ed 2, New York, 1985, Wiley & Sons.

234 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Freeman RR:

High resolution gas chromatography, ed 2, Palo Alto, Calif., 1981, Hewlett-Packard Co.

235 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Schomburg F:

Gas chromatography, a practical course, Weinheim, Germany, 1990, VCH Publishers.

236 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)



Delley R, Friedrich K:

System CG72 von bevorzugten Trennflüssigkeiten für die Gas-chromatographie, *Chromatographia* 10: 593-598, 1971.

Hawkes S, Grossman D, Hartkopf A, et al:

Preferred stationary liquids for gas chromatography, *J Chromatogr Sci* 13:115-117, 1975.

237 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Siggia S:

Instrumental methods of organic functional group analysis, New York, 1972, Wiley & Sons.

Ahuja S:

Derivatization in gas chromatography, *J Pharm Sci* 65:163, 1976.

238 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Kovats E:

The Kovats' retention index system, *Anal Chem* 36:31A, 1964.

Lorenz LJ, Roger LB:

Specification of gas chromatographic behavior using Kovats' indices and Rohrschneider constants, *Anal Chem* 43:1593-1599, 1971.

239 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Perrigo BJ, Peel HW:

The use of retention indices and temperature-programmed gas chromatography in analytical toxicology, *J Chromatogr Sci* 19:219-226, 1981.

240 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Japp M, Gill R, Osselton MD:

Comparison of drug retention indices determined on packed, wide bore capillary and narrow bore capillary columns, *J Forensic Sci* 32:1574-1586, 1987.

241 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Supina WR, Rose LP:

The use of Rohrschneider constants for classification of GLC columns, *J Chromatogr Sci* 8:217-217, 1970.

McReynolds WO:

Characterization of some liquid phases, *J Chromatogr Sci* 8:685-691, 1970.

242 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Ettre LS:

Basic relationships of gas chromatography, ed 2, Norwalk, Conn., 1979, Perkin-Elmer Corp.

243 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Fenimore DC, Whitford JJ, Davis CM, Zlatkis A:

Nickel gas chromatographic columns: an alternative to glass for biological samples, *J Chromatogr* 140:9-16, 1977.

244 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

David DJ:

Gas chromatographic detectors, New York, 1974, Wiley & Sons.

Sevcik J:

Detectors in gas chromatography, New York, 1975, Elsevier/North-Holland.

245 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Bourne S, Hefner AM, Norton KL, Griffiths PR:

Performance characteristics of a real-time direct deposition gas chromatography/Fourier transform infrared spectrometry system, *Anal Chem* 62:2448-2452, 1990.

246 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Kalasinsky KS, Levine B, Smith ML:

2548



Feasibility of using GC/FTIR for drug analysis in the forensic toxicology laboratory, *J Anal Toxicol* 16:332-336, 1991.

247 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Forman DT:

Role of the laboratory in diagnosis of organic acidurias, *Ann Clin Lab Sci* 21:85-93, 1991

248 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

McFadden WH:

Techniques of combined gas chromatography/mass spectrometry, New York, 1973, Wiley & Sons.

249 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

McFadden WH:

Techniques of combined gas chromatography/mass spectrometry, New York, 1973, Wiley & Sons.

250 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Saferstein R:

Forensic science handbook, Englewood Cliffs, N.J., 1982, Prentice-Hall, pp 92-182.

251 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Jindal SP, Vestergaard P:

Quantitation of cocaine and its principal metabolite, benzoylecgonine, by GLC/mass spectrometry using stable isotope labeled analogues as internal standards, *J Pharm Sci* 67:811-814, 1978.

252 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

McLafferty FW:

Interpretation of mass spectra, ed 3, Mill Valley, Calif., 1980, University Science Book.

Silverstein RM, Bassler CG:

Spectrometrical identification of organic compounds, New York, 1967, Wiley & Sons.

Budzikiewicz H, Djerassi C, Williams DH:

Mass spectrometry of organic compounds, San Francisco, 1967, Holden-Day Inc.

253 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Lehrer M:

Application of gas chromatography/mass spectrometry instrument techniques to forensic urine drug testing, *Clin Lab Med* 10:271-288, 1990.

254 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Hewlett-Packard technical application:

GC/MS confirmation of amphetamines, publication #23-5954-8146, Waltham, Mass., Jan 1987, Hewlett-Packard Co.

255 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

deJong EG, Maes RA, van Rossum JM:

Why do doping control labs need MS/MS? Presented at the International Symposium on Applied Mass Spectrometry in the Health Sciences, Barcelona, Spain, Sept 28, 1987.

256 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Saferstein R:

Forensic science handbook, Englewood Cliffs, N.J., 1982, Prentice-Hall, pp 92-182.

257 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Deutsch DG:

Analytical aspects of drug testing, chemical analysis series, New York, 1989, Wiley & Sons, pp 87-128.

258 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Peat MA:

Analytical and technical aspects of testing for drug abuse: confirmatory procedures, *Clin Chem* 34(3):471-473, 1988.

259 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)



McFadden WH:

Techniques of combined gas chromatography/mass spectrometry, New York, 1973, Wiley & Sons.

260 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Iribane JV, Thomson BA:

On the evaporation of small ions from charged droplets, *J Chem Physiol* 64:2287, 1976.

261 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

The API book, Eden Prairie, Minn., 1992, Perkin-Elmer Sciex.

262 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Lehrer M, Karmen A:

Chemical ionization mass spectrometry for rapid assay of drugs in serum, *J Chromatogr* 126:615-624, 1976.

Saferstein R:

Drug detection in urine by chemical ionization mass spectrometry, *J Forensic Sci* 23:29-39, 1978.

263 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Yost RA, Johnson JV:

Tandem mass spectrometry for trace analysis, *Anal Chem* 57(7):758A-768A, 1985.

264 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Glish GL, Shaddock VM, Harmon K:

Rapid analysis of complex mixtures by mass spectrometry, *Anal Chem* 52:165-167, 1980.

Lee MS, Yost RA:

Rapid identification of drug metabolites with tandem mass spectrometry, *Biomed Environ Mass Spectrometry* 15:193-204, 1988.

Weiss MD:

Chemistry is winning the war against crime, *Industrial Chemist* 15:28-34, Feb 1988.

265 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Federal Register:

Mandatory guidelines for federal workplace drug testing: final guidelines, April 11, 1988.

266 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Lehrer M:

Drug screening in the workplace, *Clin Lab Med* 7(2):389-400, 1987.

267 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Hoyt DW, Finnigan RE, Nee T, et al:

Drug testing in the workplace: are methods legally defensible? *JAMA* 258(4):504-509, 1987.

268 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Peat MA:

Analytical and technical aspects of testing for drug abuse: confirmatory procedures, *Clin Chem* 34(3):471-473, 1988.

Blau K, King GS, editors:

Handbook of derivatives for chromatography, Philadelphia, 1978, Heyden & Sons.

Foltz RL, Fentiman AF, Foltz RB:

GC/MS assays for abused drugs in body fluids, National Institute of Drug Abuse monogr no 32, DHHS publ no (ADM) 80-1014, Washington, D.C., 1980.

Hawks RL, Chiang CN:

Urine testing for drugs of abuse, National Institute of Drug Abuse monogr. no 73, DHHS publ no (ADM) 87-1481, Washington, D.C., 1987.

269 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Van Holde KE:



Physical biochemistry, ed 2, Englewood Cliffs, N.J., 1985, Prentice-Hall.

270 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Moore WJ:

Physical chemistry, ed 4, Englewood Cliffs, N.J., 1970, Prentice-Hall.

271 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Van Holde KE:

Physical biochemistry, ed 2, Englewood Cliffs, N.J., 1985, Prentice-Hall.

Tanford C:

Physical chemistry of macromolecules, New York, 1961, Academic Press.

272 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Tanford C:

Physical chemistry of macromolecules, New York, 1961, Academic Press.

273 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Moore WJ:

Physical chemistry, ed 4, Englewood Cliffs, N.J., 1970, Prentice-Hall.

274 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Melvin M: *Electrophoresis*, New York, 1987, Wiley & Sons.

275 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Moore WJ:

Physical chemistry, ed 4, Englewood Cliffs, N.J., 1970, Prentice-Hall.

276 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Andrews AT:

Electrophoresis: theory, techniques, and biochemical and clinical applications, ed 2, New York, 1986, Oxford University Press.

277 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Dunn MJ, editor:

Electrophoresis '86, Deerfield Beach, Fla., 1986, VCH Verlagsgesellschaft.

278 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Lemkin PF, Lipkin LE:

GELLAB: a computer system for 2D gel electrophoresis analysis. II. Pairing spots, *Comput Biomed Res* 14:355, 1981.

279 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Towbin H, Staehelin T, Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets, *Proc Nat Acad Sci USA* 76:4350, 1979.

280 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Dunn MJ, editor:

Electrophoresis '86, Deerfield Beach, Fla., 1986, VCH Verlagsgesellschaft.

281 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Allington RW, Nelson JW, Aron GG:

ISCO Applications Research Bulletin, no 18, Lincoln, Neb., 1975, Instrumentation Specialties Co. (ISCO, Inc.).

282 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Green MR, Pastewka JV:

Identification of sialic acid-rich glycoproteins on polyacrylamide gels, *Anal Biochem* 65:66, 1975.

283 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Merril CR, Goldman D, Sedman SA, Ebert MH:

Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in



cerebrospinal fluid proteins, *Science* 211:1437, 1981.

284 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Righetti PG, Drysdale JW:

Isoelectric focusing, New York, 1976, Academic Press.

285 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Andrews AT:

Electrophoresis: theory, techniques, and biochemical and clinical applications, ed 2, New York, 1986, Oxford University Press.

286 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Righetti PG, Drysdale JW:

Isoelectric focusing, New York, 1976, Academic Press.

287 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

O'Farrell PH:

High-resolution two-dimensional electrophoresis of proteins, *J Biol Chem* 250:4007, 1975.

Annino JS, Giese RW:

Clinical chemistry, principles and procedures, ed 4, Boston, 1976, Little, Brown & Co.

288 (Ventana-emergente - Popup)

Ornstein L:

Disc electrophoresis, *Ann NY Acad Sci* 121:321, 1964.

Brewer JM, Ashworth RB:

Disc electrophoresis, *J Chem Educ* 46:41, 1969.

289 (Ventana-emergente - Popup)

Melvin M:

Electrophoresis, New York, 1987, Wiley & Sons.

Ornstein L:

Disc electrophoresis, *Ann NY Acad Sci* 121:321, 1964.

Brewer JM, Ashworth RB:

Disc electrophoresis, *J Chem Educ* 46:41, 1969.

290 (Ventana-emergente - Popup)

Deyl Z, Everaerts FM, Prusik Z, Svendsen PJ:

Electrophoresis: a survey of techniques and applications, *J Chromatogr* 18 (series), 1979.

Ornstein L:

Disc electrophoresis, *Ann NY Acad Sci* 121:321, 1964.

Jovin TM, Dante ML, Chrambach A:

Multiphasic buffer systems output PB 196085 to 196092 and 203016, Springfield, Va., 1970, National Technical Information Service.

Fagerhold MK, Laurell CB:

The Pi system-inherited variants of serum alpha-1-antitrypsin, *Prog Med Genet* 7:96, 1970.

291 (Ventana-emergente - Popup)

Andrews AT:

Electrophoresis: theory, techniques, and biochemical and clinical applications, ed 2, New York, 1986, Oxford University Press.

292 (Ventana-emergente - Popup)



Laemmli UK:

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227:680, 1970.

Wyckoff M, Rodbard D, Chrambach A:

Polyacrilamide gel electrophoresis in sodium dodecyl sulfate-containing buffers using multiphasic buffer systems, *Anal Biochem* 78:459, 1977.

293 (Ventana-emergente - Popup)

Andrews AT:

Electrophoresis: theory, techniques, and biochemical and clinical applications, ed 2, New York, 1986, Oxford University Press.

294 (Ventana-emergente - Popup)

O'Farrell PH:

High-resolution two-dimensional electrophoresis of proteins, *J Biol Chem* 250:4007, 1975.

295 (Ventana-emergente - Popup)

O'Farrell PH:

High-resolution two-dimensional electrophoresis of proteins, *J Biol Chem* 250:4007, 1975.

Dunn MJ, editor:

Electrophoresis '86, Deerfield Beach, Fla., 1986, VCH Verlagsgesellschaft.

296 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Demedts P, Theunis L, Wauters A, et al:

Excess serum osmolality gap after ingestion of methanol: a methodology associated phenomenon? *Clin Chem* 40:1587-1590, 1994.

297 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Binder HJ:

The gastroenterologist's osmotic gap: fact or fiction? *Gastroenterology* 103:702-704, 1992.

298 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Topazian M, Binder HJ:

Brief report: factitious diarrhea detected by measurement of stool osmolality, *N Engl J Med* 330:1418-1419, 1994.

299 (Ventana-emergente - Popup)

Sittig DF, Stead WW:

Computer-based physician order entry: the state of the art, *JAMA* 1(2):108-123, 1994.

300 (Ventana-emergente - Popup)

Weilert M, Tilzer LL:

Putting bar codes to work for improved patient care, *Clin Lab Med* 11:227-238, 1991.

301 (Ventana-emergente - Popup)

EIA standard RS-232-C, Washington, D.C., 1969, Electronic Industries Association.

302 (Ventana-emergente - Popup)

ASTM designation E1381-91, specification for low-level protocol to transfer messages between clinical laboratory instruments and computer systems, 1994 Annual book of ASTM standards, vol 14.01, Philadelphia, 1994, American Society for Testing and Materials, pp 311-317.



303 (Ventana-emergente - Popup)

ASTM designation E1381-91, specification for low-level protocol to transfer messages between clinical laboratory instruments and computer systems, 1994 Annual book of ASTM standards, vol 14.01, Philadelphia, 1994, American Society for Testing and Materials, pp 311-317.

304 (Ventana-emergente - Popup)

ASTM designation E1466-92, standard specification for use of bar codes on specimen tubes in the clinical laboratory, 1994 Annual book of ASTM standards, vol 14.01, Philadelphia, 1994, American Society for Testing and Materials, pp 407-409.

305 (Ventana-emergente - Popup)

Westgard JO, Barry PL, Hunt MR, et al:

A multi-rule Shewhart chart for quality control in clinical chemistry, Clin Chem 27:493-501, 1981.

306 (Ventana-emergente - Popup)

Ladensen JH:

Patients as their own controls: use of the computer to identify "laboratory error," Clin Chem 21:1648-1653, 1975.

Lezotte D, Grams RR:

Determining clinical significance in repeated laboratory measurements-the "clinical delta range," J Med Systems 3:175-191, 1979.

307 (Ventana-emergente - Popup)

Koss W, Sodeman T:

The workload recording method: a laboratory management tool, Clin Lab Med 12:337-350, 1991.

308 (Ventana-emergente - Popup)

Friedman B, Mitchell W:

Horizontal and vertical integration in hospital laboratories and the laboratory information system, Clin Lab Med 10:627-641, 1990.

309 (Ventana-emergente - Popup)

Friedman B, Mitchell W:

Horizontal and vertical integration in hospital laboratories and the laboratory information system, Clin Lab Med 10:627-641, 1990.

310 (Ventana-emergente - Popup)

Bakker AR:

Security in medical information systems. In Bemmell JH, McCray AT, editors: 1993 Yearbook of medical informatics, sharing knowledge and information, Stuttgart, Germany, 1993, Schattauer, pp 52-60.

311 (Ventana-emergente - Popup)

Bakker AR:

Security in medical information systems. In Bemmell JH, McCray AT, editors: 1993 Yearbook of medical informatics, sharing knowledge and information, Stuttgart, Germany, 1993, Schattauer, pp 52-60.

312 (Ventana-emergente - Popup)

Gostin LO, Turek-Brezina J, Powers M, et al: Privacy and security of personal information



in a new health care system, JAMA 270 (20):2487-2493, 1993.

313 (Ventana-emergente - Popup)

Department of Health and Human Services, Health Care Financing Organization, Department of Health and Human Services, 42 CFR part 405 et al: Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988, Final Rule, Fed Register 57(40):7001-7288, 1992.

314 (Ventana-emergente - Popup)

Department of Health and Human Services, Health Care Financing Organization, Department of Health and Human Services, 42 CFR part 405 et al: Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988, Final Rule, Fed Register 57(40):7001-7288, 1992.

315 (Ventana-emergente - Popup)

Parkman PD:

FDA letter to registered blood banks on recommendations for implementation of computerization in blood establishments, April 6, 1988.

316 (Ventana-emergente - Popup)

Application of the medical device GMPS to computerized devices and manufacturing processes: medical device GMP guidance for FDA investigators, first draft, Office of Compliance and Surveillance, Division of Compliance Programs, Food and Drug Administration, Public Health Service, Department of Health and Human Services, Rockville, Md., Nov 1990.

317 (Ventana-emergente - Popup)

Butch SH:

Computer software quality assurance, Lab Med 22:18-22, 1991.

318 (Ventana-emergente - Popup)

Commission on Laboratory Accreditation: Inspection Checklist, Section 1, Laboratory general\computer services, College of American Pathologists, Northfield, Ill., 1993.

319 (Ventana-emergente - Popup)

Elevitch F, Treling C, Spackman K, et al:

A clinical laboratory information systems survey: a challenge for the decade, Arch Pathol Lab Med 117:12-21, 1993.

320 (Ventana-emergente - Popup)

ASTM designation E1238-94, standard specification for transferring clinical laboratory data messages between independent computer systems, 1994 Annual book of ASTM standards, vol 14.01, Philadelphia, 1994, American Society for Testing and Materials, pp 132-210.

McDonald CJ, Hammond WE:

Standards formats for electronic transfer of data, Ann Intern Med 110:333-335, 1989.

McDonald CJ:

Standards for the electronic transfer of clinical data: progress, promises, and the conductor's wand, Proceedings of the 14th Annual Symposium on Computer Applications in Medical Care, Los Alamitos, Calif., 1990, IEEE Computer Society Press, pp 9-14.

321 (Ventana-emergente - Popup)

GAO/IMTEC-93-17, Automated medical records-leadership needed to expedite standards development, Washington, D.C., 1993, General Accounting Office.



deMoor GJE:

Standardization in medical informatics. In Bemmél JH, McCray AT, editors: 1993 Yearbook of medical informatics, sharing knowledge and information, Stuttgart, Germany, 1993, Schattauer, pp 61-66.

322 (Ventana-emergente - Popup)

Dick RS, Steen EB, editors:

The computer-based patient record, an essential technology for health care, Washington, D.C., 1991, National Academy Press.

323 (Ventana-emergente - Popup)

GAO/IMTEC-91-5, Medical ADP systems-automated medical records hold promise to improve patient care, Washington, D.C., 1991, General Accounting Office.

324 (Ventana-emergente - Popup)

Korpman R:

Health care information systems: patient-centered integration is the key, Clin Lab Med 11:203-220, 1991.

325 (Ventana-emergente - Popup)

Barnett GO, Jenders RA, Cheuh HC:

The computer-based clinical record-where do we stand? Ann Intern Med 119:1046-1048, 1993.

326 (Ventana-emergente - Popup)

Brooks F:

The mythical man month: essays on software engineering, Reading, Mass., 1979, Addison-Wesley.

Brooks F:

No silver bullet: essence and accidents of software engineering, IEEE Computer 20:10-19, 1987.

327 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Barnett RN:

Clinical laboratory statistics, ed 2, Boston, 1979, Little, Brown & Co.

328 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Lenter C:

Geigy scientific tables, vol 2, Introduction to statistics, statistical tables, mathematical formulae, ed 8, Allschwil, Switzerland, 1982, Ciba-Geigy.

329 (Ventana-emergente - Popup)

Shott S:

Statistics for health professionals, Philadelphia, 1990, Saunders.

330 (Ventana-emergente - Popup)

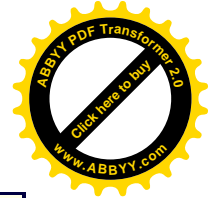
Lenter C:

Geigy scientific tables, vol 2, Introduction to statistics, statistical tables, mathematical formulae, ed 8, Allschwil, Switzerland, 1982, Ciba-Geigy. Significance limits for testing extreme values of a sample, p. 60.

331 (Ventana-emergente - Popup)

Lenter C:

Geigy scientific tables, vol 2, Introduction to statistics, statistical tables, mathematical formulae, ed 8, Allschwil, Switzerland, 1982, Ciba-Geigy. Significance limits for testing



extreme values of a sample, p. 60.

332 (Ventana-emergente - Popup)

Wallers PJM, Hellendoorn HBA, Op de Weegh GJ, Heerspink W: Applications of statistics in clinical chemistry - a critical evaluation of regression lines, Clin Chim Acta 64:173-184, 1975.

Cornbleet PJ, Gochman N:

Incorrect least-squares regression coefficients in method- comparison analysis, Clin Chem 25(3):432-438, 1979.

333 (Ventana-emergente - Popup)

Cornbleet PJ, Gochman N:

Incorrect least-squares regression coefficients in method-comparison analysis, Clin Chem 25(3):432-438, 1979.

334 (Ventana-emergente - Popup)

Cornbleet PJ, Gochman N:

Incorrect least-squares regression coefficients in method-comparison analysis, Clin Chem 25(3):432-438, 1979.

335 (Ventana-emergente - Popup)

Mason RL, Gunst RF, Hess JL:

Statistical design y analysis of experiments with applications to engineering y science, New York, 1989, Wiley & Sons.

Snedecor GW, Cochran WG:

Statistical methods, ed 8, Ames, Iowa, 1989, Iowa State University Press.

Shott S:

Statistics for health professionals, Philadelphia, 1990, Saunders.

Altman DG:

Practical statistics for medical research, New York, 1991, Chapman & Hall.

Dowdy S, Wearden S:

Statistics for research, ed 2, New York, 1991, Wiley & Sons.

336 (Ventana-emergente - Popup)

Wallers PJM, Hellendoorn HBA, Op de Weegh GJ, Heerspink W:

Applications of statistics in clinical chemistry - a critical evaluation of regression lines, Clin Chim Acta 64:173-184, 1975.

337 (Ventana-emergente - Popup)

Wallers PJM, Hellendoorn HBA, Op de Weegh GJ, Heerspink W:

Applications of statistics in clinical chemistry - a critical evaluation of regression lines, Clin Chim Acta 64:173-184, 1975.

Cornbleet PJ, Gochman N:

Incorrect least-squares regression coefficients in method- comparison analysis, Clin Chem 25(3):432-438, 1979.

338 (Ventana-emergente - Popup)

Dowdy S, Wearden S:

Statistics for research, ed 2, New York, 1991, Wiley & Sons.

339 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Solberg HE:

2557



Approved recommendation (1986) on the theory of reference values. Part 1. The concept of reference values, *Clin Chim Acta* 167:111-118, 1987; *J Clin Chem Clin Biochem* 25:337-342, 1987; *Ann Biol Clin* 45:237-241, 1987; *Labmedica* 4:27-31, 1987.

340 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

National Committee for Clinical Laboratory Standards:

User comparison of quantitative clinical laboratory methods using patient samples: proposed guideline. NCCLS document EP9-P (ISBN 1-56238-021-4), Villanova, Penn., 1985, NCCLS.

341 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

National Committee for Clinical Laboratory Standards:

How to define and determine reference intervals in the clinical laboratory: approved guideline, NCCLS document C28-A (ISBN 1-56238-269-1), Villanova, Penn., 1995, NCCLS. Copies of the current edition may be obtained from NCCLS, 771 E. Lancaster Avenue, Villanova, PA 19085.

PetitClerc C, Solberg HEL:

Approved recommendation (1987) on the theory of reference values. Part 2. Selection of individuals for the production of reference values, *J Clin Chem Clin Biochem* 25:639-644, 1987; *Clin Chim Acta* 170:S1-S12, 1987.

Solberg HE:

Establishment and use of reference values. In Tietz Textbook of clinical chemistry, 2nd ed., Burtis CA, Ashwood ER, editors, Philadelphia, 1994, Saunders.

342 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Schultz EK:

Analytical goals and clinical relevance of laboratory procedures. In Tietz NW, editor: Textbook of clinical chemistry, Philadelphia, 1986, Saunders.

Hjelm M:

Preparing reference individuals for blood collection. In Grasbeck R, Alstrom T, editors: Reference values in laboratory medicine, New York, 1981, Wiley & Sons.

343 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

National Committee for Clinical Laboratory Standards: Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture: approved standard, ed 3, NCCLS document H3-A3 (ISBN 1-56238-108-3), Villanova, Penn., 1991, NCCLS.

National Committee for Clinical Laboratory Standards: Procedures for the handling and processing of blood specimens: approved guideline, NCCLS document H18-A (ISBN 1-56238-110-5), Villanova, Penn., 1990, NCCLS.

344 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

National Committee for Clinical Laboratory Standards: Internal quality control testing: principles and definitions: approved guideline, NCCLS document C24-A (ISBN 1-56338-112-1), Villanova, Penn., 1990, NCCLS.

345 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

National Committee for Clinical Laboratory Standards: *How to define and determine reference intervals in the clinical laboratory: approved guideline*, NCCLS document C28-A (ISBN 1-56238-269-1), Villanova, Penn., 1995, NCCLS. Copies of the current edition may be obtained from NCCLS, 771 E. Lancaster Avenue, Villanova, PA 19085.

346 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Solberg HE:

Approved recommendations (1987) on the theory of reference values. Part 5. Statistical treatment of collected reference values: determination of reference limits, *J Clin Chem Clin Biochem* 25:645-656, 1987; *Clin Chim Acta* 170:S13-S32, 1987.

Solberg HE:



Establishment and use of reference values. In Tietz Textbook of clinical chemistry, 2nd ed., Burtis CA, Ashwood ER, editors, Philadelphia, 1994, Saunders.

347 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Reed AH, Henry RJ, Mason WB:

Influence of statistical method used on the resulting estimate of normal range, Clin Chem 17:275-284, 1971.

348 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Lott JA, Mitchell LC, Moeschberger ML, Sutherland DE:

Estimation of reference ranges: how many subjects are needed, Clin Chem 38:648-650, 1992.

349 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Linnet K:

Two-stage transformation systems for normalization of reference distributions evaluated, Clin Chem 33:381-386, 1987.

350 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Barnett V, Lewis T:

Outliers in statistical data, New York, 1978, Wiley & Sons, pp 68-73.

351 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Reed AH, Henry RJ, Mason WB:

Influence of statistical method used on the resulting estimate of normal range, Clin Chem 17:275-284, 1971.

352 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Barnett V, Lewis T:

Outliers in statistical data, New York, 1978, Wiley & Sons, pp 68-73.

353 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Harris EK, Boyd JC:

On dividing reference data into subgroups to produce separate reference ranges, Clin Chem 36:265-270, 1990.

354 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

National Committee for Clinical Laboratory Standards:

How to define and determine reference intervals in the clinical laboratory: approved guideline, NCCLS document C28-A (ISBN 1-56238-269-1), Villanova, Penn., 1995, NCCLS. Copies of the current edition may be obtained from NCCLS, 771 E. Lancaster Avenue, Villanova, PA 19085.

Harris EK, Boyd JC:

On dividing reference data into subgroups to produce separate reference ranges, Clin Chem 36:265-270, 1990.

355 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

National Committee for Clinical Laboratory Standards: User comparison of quantitative clinical laboratory methods using patient samples: proposed guideline. NCCLS document EP9-P (ISBN 1-56238-021-4), Villanova, Penn., 1985, NCCLS.

356 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Young DS:

Determination and validation of reference intervals, Arch Pathol Lab Med 116:704-709, 1992.

357 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Statland BE, Winkel P, Burke DM, Galen RS: Quantitative approaches used in evaluating laboratory measurements and other clinical data. In Clinical diagnosis and management by laboratory methods, Henry JB, editor: Philadelphia, 1979, Saunders.

Galen RS, Gambino SR:



Beyond normality: the predictive value and efficacy of medical diagnoses, New York, 1975, Wiley & Sons.

358 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Young DS:

Determination and validation of reference intervals, Arch Pathol Lab Med 116:704-709, 1992.

359 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Galen RS, Gambino SR:

Beyond normality: the predictive value and efficacy of medical diagnoses, New York, 1975, Wiley & Sons.

360 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Galen RS, Gambino SR:

Beyond normality: the predictive value and efficacy of medical diagnoses, New York, 1975, Wiley & Sons.

361 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Zweig MH, Broste SK, Reinhart RA:

ROC curve analysis: an example showing the relationships among serum lipid and apolipoprotein concentrations in identifying patients with coronary artery disease, Clin Chem 38:1425-1428, 1992.

362 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Zweig MH, Broste SK, Reinhart RA:

ROC curve analysis: an example showing the relationships among serum lipid and apolipoprotein concentrations in identifying patients with coronary artery disease, Clin Chem 38:1425-1428, 1992.

363 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Zweig MH, Campbell G:

Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine, Clin Chem 39:561-577, 1993.

364 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Gerhardt W:

The Bayes approach: systematic graphic evaluation of diagnostic tests. In Keller H, Trendelenburg CH, editors: Data presentation, interpretation, New York, 1989, Walter de Gruyter.

365 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Lott JA, Lu CJ:

Lipase isoforms and amylase isoenzymes: assays and application in the diagnosis of acute pancreatitis, Clin Chem 37:361-368, 1991.

366 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Obzansky D:

Personal communication, Wilmington, Del.

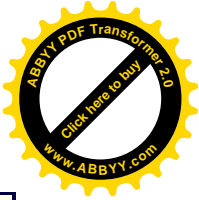
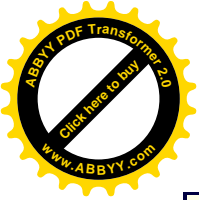
367 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Galen RS, Gambino SR:

Beyond normality: the predictive value and efficacy of medical diagnoses, New York, 1975, Wiley & Sons.

368 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Statland BE, Winkel P, Burke DM, Galen RS: Quantitative approaches used in evaluating laboratory measurements and other clinical data. In Clinical diagnosis and management by laboratory methods, Henry JB,



editor: Philadelphia, 1979, Saunders.

369 (Ventana-emergente - Popup)

National Committee for Clinical Laboratory Standards: Development of certified reference materials for the National Reference System for the Clinical Laboratory, approved guideline, NCCLS publication NRSL3-A (ISBN 1-56238-106-7), Villanova, Penn., 1991, NCCLS.

370 (Ventana-emergente - Popup)

Dorsey DB:

Evolving concepts of quality in laboratory practice: a historical overview of quality assurance in clinical laboratories, Arch Pathol Lab Med 113:1329-1334, 1989.

Harris EK:

Statistical principles underlying analytic goal-setting in clinical chemistry, Am J Clin Pathol 72:374-382, 1979.

371 (Ventana-emergente - Popup)

Koch DD, Oryall JJ, Quam EF, et al:

Selection of medically useful quality- control procedures for individual tests done in a multitest analytical system, Clin Chem 36:230-233, 1990.

372 (Ventana-emergente - Popup)

Ehrmeyer SS, Laessig RH, Leinweber JE, Oryall JJ: 1990 Medicare/CLIA final rules for proficiency testing: minimum intralaboratory performance characteristics (CV and bias) needed to pass, Clin Chem 36:1736-1740, 1990.

373 (Ventana-emergente - Popup)

Barnett RN:

Analytic goals in clinical chemistry: the pathologist's viewpoint. In Analytical goals in clinical chemistry, Northfield, Ill., June 1977, College of American Pathologists, pp 319-322.

Ehrmeyer SS, Laessig RH:

The relationship of intralaboratory bias and imprecision on laboratories' ability to meet medical usefulness limits, Am J Clin Pathol 89:14-18, 1988.

Ehrmeyer SS, Laessig RH, Leinweber JE, Oryall JJ:

1990 Medicare/CLIA final rules for proficiency testing: minimum intralaboratory performance characteristics (CV and bias) needed to pass, Clin Chem 36:1736-1740, 1990.

Tonks DB:

A study of the accuracy and precision of clinical chemistry determination in 170 Canadian laboratories, Clin Chem 9:217-233, 1963.

374 (Ventana-emergente - Popup)

Barnett RN:

Clinical laboratory statistics, ed 2, Boston, 1979, Little, Brown & Co.

Douville P, Cembrowski, GS:

An approach to the use of clinical limits for quality control, Lab Med, pp 406-409, June 1989.

Gilbert RK:

Progress and analytic goals in clinical chemistry, Am J Clin Pathol 63:960-973, 1975.



Koch DD, Oryall JJ, Quam EF, et al:

Selection of medically useful quality-control procedures for individual tests done in a multitest analytical system, Clin Chem 36:230-233, 1990.

Ross JW, et al:

Goals for allowable analytical error better based on medical usefulness criteria, Am J Clin Pathol 85:391-392, 1986.

Skendzel LP, Barnett RN, Platt R:

Medically useful criteria for analytic performance of laboratory tests, Am J Clin Pathol 83:200-205, 1985.

Turcotte G, Bourget C, Talbot J, et al:

Analytic clinical chemistry precision and medical needs: the Canadian interlab program (CID), Am J Clin Pathol 74:336-339, 1980.

375 (Ventana-emergente - Popup)

National Cholesterol Education Program:

Recommendations for improving cholesterol measurements, NIH Publication No. 90-2964, Bethesda, Md., Feb. 1990, US Department of Health and Human Services, National Institutes of Health.

Oxley DK:

Cholesterol measurements: quality assurance and medical usefulness interrelationships, Arch Pathol Lab Med 112:387-391, 1988.

376 (Ventana-emergente - Popup)

Cotlove E, Harris EK, Williams GZ:

Biological and analytic components of variation in long-term studies of serum constituents in normal subjects: III. Physiological and medical implications, Clin Chem 16:1028-1032, 1970.

Elion-Gerritzen WE:

Analytic precision in clinical chemistry and medical decisions, Am J Clin Pathol 73:183-195, 1980.

Linnet K:

Choosing quality-control systems to detect maximum clinically allowable analytical errors, Clin Chem 35:284-288, 1989.

Skendzel LP:

How physicians use laboratory tests, JAMA 239:1077-1080, 1978.

377 (Ventana-emergente - Popup)

Fraser CG:

The application of theoretical goals based on biological variation data in proficiency testing, Arch Pathol Lab Med 112:404-415, 1988.

Young DS, Harris EK, Cotlove E:

Biological and analytic components of variation in long-term studies of serum constituents in normal subjects. IV. Results of a study designed to eliminate long-term analytic deviations, Clin Chem 17:403-410, 1971.

378 (Ventana-emergente - Popup)

Bowers GN Jr:



Clinical chemistry analyte reference systems based on true value, Clin Chem 37:1665-1666, 1991.

Castaneda-Mendez K,

Chemometrics: measurement reliability, Clin Chem 34:2494-2498, 1988.

Lasky FD:

Proficiency testing linked to the National Reference System for the Clinical Laboratory: a proposal for achieving accuracy, Clin Chem 38:1260-1267, 1992.

National Committee for Clinical Laboratory Standards:

Development of definitive methods for the National Reference System for the Clinical Laboratory, approved guideline, NCCLS publication NRSC1-A (ISBN 1-56238-104-0), Villanova, Penn., 1991, NCCLS.

National Committee for Clinical Laboratory Standards:

Development of Reference Methods for the National Reference System for the Clinical Laboratory, approved guideline, NCCLS publication NRSC2-A (ISBN 1-56238-105-9), Villanova, Penn., 1991, NCCLS.

National Committee for Clinical Laboratory Standards:

Development of certified reference materials for the National Reference System for the Clinical Laboratory, approved guideline, NCCLS publication NRSC3-A (ISBN 1-56238-106-7), Villanova, Penn., 1991, NCCLS.

379 (Ventana-emergente - Popup)

Ehrmeyer SS, Laessig RH:

The relationship of intralaboratory bias and imprecision on laboratories' ability to meet medical usefulness limits, Am J Clin Pathol 89:14-18, 1988.

Ehrmeyer SS, Laessig RH, Leinweber JE, Oryall JJ:

1990 Medicare/CLIA final rules for proficiency testing: minimum intralaboratory performance characteristics (CV and bias) needed to pass, Clin Chem 36:1736-1740, 1990.

Ross JW, et al:

Goals for allowable analytical error better based on medical usefulness criteria, Am J Clin Pathol 85:391-392, 1986.

380 (Ventana-emergente - Popup)

Carey RN:

Implementation of multi-rule quality control procedures, Lab Med, pp 393-399, June 1989.

Groth T, Falk H, Westgard JO:

An interactive computer simulation program for the design of statistical control procedures in clinical chemistry, Comput Programs Biomed 13:73-86, 1981.

Koch DD, Oryall JJ, Quam EF, et al:

Selection of medically useful quality-control procedures for individual tests done in a multitest analytical system, Clin Chem 36:230-233, 1990.

Parvin CA:

Comparing the power of quality-control rules to detect persistent systematic error, Clin Chem 38:358-363, 1992.

381 (Ventana-emergente - Popup)



Parvin CA:

Comparing the power of quality-control rules to detect persistent increases in random error, Clin Chem 38:364-369, 1992.

Westgard JO, Groth T, Aronsson T, et al:

Performance characteristics of rules for internal quality control: probabilities for false rejection and error detection, Clin Chem 23:1857-1867, 1977.

Westgard JO, Groth T:

Power functions for statistical control rules, Clin Chem 25:863-869, 1979.

Westgard JO, Oryall JJ, Koch DD:

Predicting effects of quality-control practices on the cost-effective operation of a stable multitest analytical system, Clin Chem 36:1760-1764, 1990.

382 (Ventana-emergente - Popup)

Westgard JO, Groth T:

Power functions for statistical control rules, Clin Chem 25:863-869, 1979.

383 (Ventana-emergente - Popup)

Westgard JO, Barry PL, Hunt MR, Groth T:

A multi-rule Shewhart chart for quality control in clinical chemistry, Clin Chem 27:493-501, 1981.

384 (Ventana-emergente - Popup)

Koch DD, Oryall JJ, Quam EF, et al:

Selection of medically useful quality-control procedures for individual tests done in a multitest analytical system, Clin Chem 36:230-233, 1990.

385 (Ventana-emergente - Popup)

Levey S, Jennings ER:

The use of control charts in the clinical laboratory, Am J Clin Pathol 20:1059-1066, 1950.

Shewhart WA:

Economic control of quality of the manufactured product, New York, 1931, Van Nostrand Co.

386 (Ventana-emergente - Popup)

Ladenson JH:

Patients as their own controls: use of the computer to identify "laboratory error," Clin Chem 21:1648-1653, 1975.

387 (Ventana-emergente - Popup)

Hartmann AE, Naito HK, Burnett RW, Welch MJ:

Accuracy of participant results utilized as target values in the CAP Chemistry Survey Program, Arch Pathol Lab Med 109:894-903, 1985.

388 (Ventana-emergente - Popup)

Gilbert RK:

Accuracy of clinical laboratories studied by comparison with definitive methods, Am J Clin Pathol 70:450-470, 1978.

National Committee for Clinical Laboratory Standards:

Development of definitive methods for the National Reference System for the Clinical



Laboratory, approved guideline, NCCLS publication NRSL1-A (ISBN 1-56238-104-0), Villanova, Penn., 1991, NCCLS.

Velapoldi RA, Paule RC, Schaffer R, et al:

A reference method for the determination of potassium in serum, NBS spec pub no 260-63, Washington, D.C., 1979, National Measurement Laboratory, National Bureau of Standards.

389 (Ventana-emergente - Popup)

National Committee for Clinical Laboratory Standards: Development of Reference Methods for the National Reference System for the Clinical Laboratory, approved guideline, NCCLS publication NRSL2-A (ISBN 1-56238-105-9), Villanova, Penn., 1991, NCCLS.

390 (Ventana-emergente - Popup)

Hartmann AE, Naito HK, Burnett RW, Welch MJ: Accuracy of participant results utilized as target values in the CAP Chemistry Survey Program, Arch Pathol Lab Med 109:894-903, 1985.

391 (Ventana-emergente - Popup)

Uldall A:

Quality assurance within clinical chemistry\Ma brief review emphasizing "good laboratory practice," Scand J Clin Lab Invest 47(suppl 187):507-518, 1987.

392 (Ventana-emergente - Popup)

Buttner R, Borth R, Boutwell JH, et al:

Approved recommendation (1978) on quality control in clinical chemistry. Part 1. General principles and terminology, Clin Chim Acta 98:129F-143F, 1979.

393 (Ventana-emergente - Popup)

Westgard JO, de Vos DJ, Hunt MR, et al:

Concepts and practices in the selection and evaluation of methods, Am J Med Technol: Part I, Background and approach, 44:290-300, 1978; Part II, Experimental procedures, 44:420-430, 1978; Part III, Statistics, 44:552-571, 1978; Part IV, Decision on acceptability, 44:727-742, 1978; Part V, Applications, 44:803-813, 1978.

394 (Ventana-emergente - Popup)

Westgard JO, de Vos DJ, Hunt MR, et al:

Concepts and practices in the selection and evaluation of methods, Am J Med Technol: Part I, Background and approach, 44:290-300, 1978; Part II, Experimental procedures, 44:420-430, 1978; Part III, Statistics, 44:552-571, 1978; Part IV, Decision on acceptability, 44:727-742, 1978; Part V, Applications, 44:803-813, 1978.

395 (Ventana-emergente - Popup)

Westgard JO, de Vos DJ, Hunt MR, et al:

Concepts and practices in the selection and evaluation of methods, Am J Med Technol: Part I, Background and approach, 44:290-300, 1978; Part II, Experimental procedures, 44:420-430, 1978; Part III, Statistics, 44:552-571, 1978; Part IV, Decision on acceptability, 44:727-742, 1978; Part V, Applications, 44:803-813, 1978.

396 (Ventana-emergente - Popup)

Health Care Financing Administration (42 CFR Part 405, et al.), the Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services:

Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988, Final Rule; Fed Reg



57:7003-7288, Feb 28, 1992.

397 (Ventana-emergente - Popup)

Health Care Financing Administration (42 CFR Part 405, et al.), the Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services:

Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988, Final Rule; Fed Reg 57:7003-7288, Feb 28, 1992.

398 (Ventana-emergente - Popup)

Buttner R, Borth R, Boutwell JH, et al:

Approved recommendation (1978) on quality control in clinical chemistry. Part 1. General principles and terminology, Clin Chim Acta 98:129F-143F, 1979.

399 (Ventana-emergente - Popup)

Westgard JO, de Vos DJ, Hunt MR, et al:

Concepts and practices in the selection and evaluation of methods, Am J Med Technol: Part I, Background and approach, 44:290-300, 1978; Part II, Experimental procedures, 44:420-430, 1978; Part III, Statistics, 44:552-571, 1978; Part IV, Decision on acceptability, 44:727-742, 1978; Part V, Applications, 44:803-813, 1978.

National Committee for Clinical Laboratory Standards:

NCCLS proposed guideline EP9-T, User comparison of quantitative clinical laboratory methods using patient samples, Subcommittee on User Comparison of Methods of the Evaluation Protocols Area Committee, Villanova, Penn., 1993, NCCLS.

400 (Ventana-emergente - Popup)

Westgard JO, de Vos DJ, Hunt MR, et al:

Concepts and practices in the selection and evaluation of methods, Am J Med Technol: Part I, Background and approach, 44:290-300, 1978; Part II, Experimental procedures, 44:420-430, 1978; Part III, Statistics, 44:552-571, 1978; Part IV, Decision on acceptability, 44:727-742, 1978; Part V, Applications, 44:803-813, 1978.

National Committee for Clinical Laboratory Standards:

NCCLS proposed guideline EP7-P, Interference testing in clinical chemistry, Subcommittee on Interference Testing of the Evaluation Protocols Area Committee, Villanova, Penn., 1986, NCCLS.

401 (Ventana-emergente - Popup)

Westgard JO, de Vos DJ, Hunt MR, et al:

Concepts and practices in the selection and evaluation of methods, Am J Med Technol: Part I, Background and approach, 44:290-300, 1978; Part II, Experimental procedures, 44:420-430, 1978; Part III, Statistics, 44:552-571, 1978; Part IV, Decision on acceptability, 44:727-742, 1978; Part V, Applications, 44:803-813, 1978.

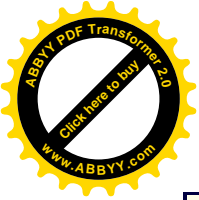
402 (Ventana-emergente - Popup)

Westgard JO, de Vos DJ, Hunt MR, et al:

Concepts and practices in the selection and evaluation of methods, Am J Med Technol: Part I, Background and approach, 44:290-300, 1978; Part II, Experimental procedures, 44:420-430, 1978; Part III, Statistics, 44:552-571, 1978; Part IV, Decision on acceptability, 44:727-742, 1978; Part V, Applications, 44:803-813, 1978.

National Committee for Clinical Laboratory Standards:

NCCLS proposed guideline EP5-T2, Proposed guidelines for user evaluation of



precision performance of clinical chemistry devices, Subcommittee for User Evaluation of Precision of the Evaluation Protocols Area Committee, Villanova, Penn., 1992, NCCLS.

403 (Ventana-emergente - Popup)

Buttner R, Borth R, Boutwell JH, et al:

Approved recommendation (1978) on quality control in clinical chemistry. Part 1. General principles and terminology, Clin Chim Acta 98:129F-143F, 1979.

404 (Ventana-emergente - Popup)

Buttner R, Borth R, Boutwell JH, et al:

Approved recommendation (1978) on quality control in clinical chemistry. Part 1. General principles and terminology, Clin Chim Acta 98:129F-143F, 1979.

405 (Ventana-emergente - Popup)

Westgard JO, de Vos DJ, Hunt MR, et al:

Concepts and practices in the selection and evaluation of methods, Am J Med Technol: Part I, Background and approach, 44:290-300, 1978; Part II, Experimental procedures, 44:420-430, 1978; Part III, Statistics, 44:552-571, 1978; Part IV, Decision on acceptability, 44:727-742, 1978; Part V, Applications, 44:803-813, 1978.

406 (Ventana-emergente - Popup)

Westgard JO, de Vos DJ, Hunt MR, et al:

Concepts and practices in the selection and evaluation of methods, Am J Med Technol: Part I, Background and approach, 44:290-300, 1978; Part II, Experimental procedures, 44:420-430, 1978; Part III, Statistics, 44:552-571, 1978; Part IV, Decision on acceptability, 44:727-742, 1978; Part V, Applications, 44:803-813, 1978.

407 (Ventana-emergente - Popup)

Buttner R, Borth R, Boutwell JH, et al:

Approved recommendation (1978) on quality control in clinical chemistry. Part 1. General principles and terminology, Clin Chim Acta 98:129F-143F, 1979.

408 (Ventana-emergente - Popup)

Buttner R, Borth R, Boutwell JH, et al:

Approved recommendation (1978) on quality control in clinical chemistry. Part 1. General principles and terminology, Clin Chim Acta 98:129F-143F, 1979.

409 (Ventana-emergente - Popup)

Health Care Financing Administration (42 CFR Part 405, et al.), the Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services:

Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988, Final Rule; Fed Reg 57:7003-7288, Feb 28, 1992.

410 (Ventana-emergente - Popup)

National Committee for Clinical Laboratory Standards:

NCCLS proposed guideline EP9-T, User comparison of quantitative clinical laboratory methods using patient samples, Subcommittee on User Comparison of Methods of the Evaluation Protocols Area Committee, Villanova, Penn., 1993, NCCLS.

411 (Ventana-emergente - Popup)

Buttner R, Borth R, Boutwell JH, et al:

Approved recommendation (1978) on quality control in clinical chemistry. Part 1. General principles and terminology, Clin Chim Acta 98:129F-143F, 1979.



412 (Ventana-emergente - Popup)

Buttner R, Borth R, Boutwell JH, et al:

Approved recommendation (1978) on quality control in clinical chemistry. Part 1. General principles and terminology, Clin Chim Acta 98:129F-143F, 1979.

413 (Ventana-emergente - Popup)

Health Care Financing Administration (42 CFR Part 405, et al.), the Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services:

Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988, Final Rule; Fed Reg 57:7003-7288, Feb 28, 1992.

414 (Ventana-emergente - Popup)

Westgard JO:

Precision and accuracy: concepts and assessment by method evaluation testing, CRC Crit Rev Clin Lab Sci, pp 283-330, Boca Raton, Fla., 1981, CRC Press.

415 (Ventana-emergente - Popup)

Westgard JO, de Vos DJ, Hunt MR, et al:

Concepts and practices in the selection and evaluation of methods, Am J Med Technol: Part I, Background and approach, 44:290-300, 1978; Part II, Experimental procedures, 44:420-430, 1978; Part III, Statistics, 44:552-571, 1978; Part IV, Decision on acceptability, 44:727-742, 1978; Part V, Applications, 44:803-813, 1978.

416 (Ventana-emergente - Popup)

National Committee for Clinical Laboratory Standards:

NCCLS proposed guideline EP5-T2, Proposed guidelines for user evaluation of precision performance of clinical chemistry devices, Subcommittee for User Evaluation of Precision of the Evaluation Protocols Area Committee, Villanova, Penn., 1992, NCCLS.

National Committee for Clinical Laboratory Standards:

NCCLS proposed guideline EP6-P, Evaluation of the linearity of quantitative analytical methods, Subcommittee on Linearity Performance of the Evaluation Protocols Area Committee, Villanova, Penn., 1986, NCCLS.

National Committee for Clinical Laboratory Standards:

NCCLS proposed guideline EP7-P, Interference testing in clinical chemistry, Subcommittee on Interference Testing of the Evaluation Protocols Area Committee, Villanova, Penn., 1986, NCCLS.

417 (Ventana-emergente - Popup)

National Committee for Clinical Laboratory Standards: NCCLS proposed guideline

EP9-T, User comparison of quantitative clinical laboratory methods using patient samples, Subcommittee on User Comparison of Methods of the Evaluation Protocols Area Committee, Villanova, Penn., 1993, NCCLS.

National Committee for Clinical Laboratory Standards: NCCLS tentative guideline EP10-T, preliminary evaluation of quantitative clinical methods, ed 2, tentative guideline, Evaluation Protocols Area Committee, Villanova, Penn., 1993, NCCLS.

418 (Ventana-emergente - Popup)

Health Care Financing Administration (42 CFR Part 405, et al.), the Public Health



Service, U.S.

Department of Health and Human Services: Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988, Final Rule; Fed Reg 57:7003-7288, Feb 28, 1992.

419 (Ventana-emergente - Popup)

Labeling requirements and standards development for in-vitro diagnostic products, Fed Reg 21 CFR:809-810, 1974.

420 (Ventana-emergente - Popup)

Draft guidance to manufacturers of in vitro analytical test systems for preparation of premarket submissions implementing CLIA '88, Fed Reg, pp 3592ff, Jan 12, 1993.

421 (Ventana-emergente - Popup)

Berkow R, editor:

The Merck manual of diagnosis and therapy, ed 16, Rahway, N.J., 1992, Merck Sharp & Dohme Research Laboratories, p 1129.

422 (Ventana-emergente - Popup)

Barnett RN:

Medical significance of laboratory results, Am J Clin Pathol 50:671-676, 1968.

Barnett RN:

Analytic goals in clinical chemistry: the pathologist's viewpoint. In Elevitch FR, editor: Proceedings of the 1976 Aspen conference on analytic goals in clinical chemistry, Skokie, Ill., 1977, College of American Pathologists, pp 20-24.

423 (Ventana-emergente - Popup)

Tonks D:

A study of the accuracy and precision of clinical chemistry determinations in 170 Canadian laboratories, Clin Chem 9:217-233, 1963.

424 (Ventana-emergente - Popup)

Tonks D:

A quality control program for quantitative clinical chemistry estimations, Can J Med Technol 30:38-54, 1968.

425 (Ventana-emergente - Popup)

Gilbert R:

Progress and analytic goals in clinical chemistry, Am J Clin Pathol 63:960-973, 1975.

426 (Ventana-emergente - Popup)

Cotlove E, Harris E, Williams G:

Biological and analytic components of variation in long-term studies of serum constituents in normal subjects. III. Physiological and medical implications, Clin Chem 16:1028-1032, 1970.

427 (Ventana-emergente - Popup)

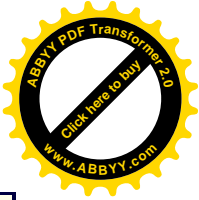
Elevitch FR, editor:

CAP Aspen Conference 1976: analytical goals in clinical chemistry, Skokie, Ill., 1977, College of American Pathologists.

428 (Ventana-emergente - Popup)

Elevitch FR, editor:

CAP Aspen Conference 1976: analytical goals in clinical chemistry, Skokie, Ill., 1977, College of American Pathologists.



429 (Ventana-emergente - Popup)

Fraser CG:

The application of theoretical goals based upon biological variation in proficiency testing, Arch Pathol Lab Med 112:404-415, 1988.

Fraser CG:

Desirable standards of performance for therapeutic drug monitoring, Clin Chem 33:387-389, 1987.

Fraser CG, Petersen PH, Ricos C, Haeckel R:

Quality specifications. In Haeckel R, editor: Evaluation methods in laboratory medicine, New York, 1993, VCH Publishers.

430 (Ventana-emergente - Popup)

Health Care Financing Administration (42 CFR Part 405, et al.), the Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services:

Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988, Final Rule; Fed Reg 57:7003-7288, Feb 28, 1992.

431 (Ventana-emergente - Popup)

Ehrmeyer SS, Laessig RH, Leinweber JE, Oryall JJ:

1990 Medicare/CLIA final rules for proficiency testing: minimum intralaboratory performance characteristics (CV and bias) needed to pass, Clin Chem 36:1736-1740, 1990.

432 (Ventana-emergente - Popup)

Westgard JO, Burnett RW:

Precision requirements for cost-effective operation of analytical processes, Clin Chem 36:1629-1632, 1990.

433 (Ventana-emergente - Popup)

Fraser CG:

The application of theoretical goals based upon biological variation in proficiency testing, Arch Pathol Lab Med 112:404-415, 1988.

Fraser CG:

Desirable standards of performance for therapeutic drug monitoring, Clin Chem 33:387-389, 1987.

Fraser CG, Petersen PH, Ricos C, Haeckel R:

Quality specifications. In Haeckel R, editor: Evaluation methods in laboratory medicine, New York, 1993, VCH Publishers.

434 (Ventana-emergente - Popup)

National Reference System for the Clinical Laboratory, NRSCL6-T, Development of methodological principles documents for analytes in the clinical laboratory: tentative guideline, National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Penn., 1989, NRSCL.

435 (Ventana-emergente - Popup)

Tremblay MM:

Evaluation of instruments in biochemistry, Can J Med Technol 41:65-76, 1979.

Shaikh AH:

A systematic procedure for selection of automated instruments in the clinical laboratory, Am J Med Technol 45:710-714, 1979.

436 (Ventana-emergente - Popup)



National Committee for Clinical Laboratory Standards:

NCCLS proposed guideline EP5-T2, Proposed guidelines for user evaluation of precision performance of clinical chemistry devices, Subcommittee for User Evaluation of Precision of the Evaluation Protocols Area Committee, Villanova, Penn., 1992, NCCLS.

National Committee for Clinical Laboratory Standards:

NCCLS proposed guideline EP6-P, Evaluation of the linearity of quantitative analytical methods, Subcommittee on Linearity Performance of the Evaluation Protocols Area Committee, Villanova, Penn., 1986, NCCLS.

National Committee for Clinical Laboratory Standards:

NCCLS proposed guideline EP7-P, Interference testing in clinical chemistry, Subcommittee on Interference Testing of the Evaluation Protocols Area Committee, Villanova, Penn., 1986, NCCLS.

437 (Ventana-emergente - Popup)

National Committee for Clinical Laboratory Standards: NCCLS proposed guideline EP9-T, User comparison of quantitative clinical laboratory methods using patient samples, Subcommittee on User Comparison of Methods of the Evaluation Protocols Area Committee, Villanova, Penn., 1993, NCCLS.

National Committee for Clinical Laboratory Standards: NCCLS tentative guideline EP10-T, preliminary evaluation of quantitative clinical methods, ed 2, tentative guideline, Evaluation Protocols Area Committee, Villanova, Penn., 1993, NCCLS.

438 (Ventana-emergente - Popup)

Buttner R, Borth R, Boutwell JH, et al: Approved recommendation (1978) on quality control in clinical chemistry. Part 1. General principles and terminology, Clin Chim Acta 98:129F-143F, 1979.

439 (Ventana-emergente - Popup)

National Committee for Clinical Laboratory Standards: NCCLS proposed guideline EP6-P, Evaluation of the linearity of quantitative analytical methods, Subcommittee on Linearity Performance of the Evaluation Protocols Area Committee, Villanova, Penn., 1986, NCCLS.

440 (Ventana-emergente - Popup)

Ehrmeyer SS, Laessig RH, Leinweber JE, Oryall JJ:

1990 Medicare/CLIA final rules for proficiency testing: minimum intralaboratory performance characteristics (CV and bias) needed to pass, Clin Chem 36:1736-1740, 1990.

Westgard JO, Burnett RW:

Precision requirements for cost-effective operation of analytical processes, Clin Chem 36:1629-1632, 1990.

441 (Ventana-emergente - Popup)

National Committee for Clinical Laboratory Standards:

NCCLS proposed guideline EP7-P, Interference testing in clinical chemistry, Subcommittee on Interference Testing of the Evaluation Protocols Area Committee, Villanova, Penn., 1986, NCCLS.



442 (Ventana-emergente - Popup)

National Committee for Clinical Laboratory Standards:

NCCLS proposed guideline EP7-P, Interference testing in clinical chemistry, Subcommittee on Interference Testing of the Evaluation Protocols Area Committee, Villanova, Penn., 1986, NCCLS.

443 (Ventana-emergente - Popup)

Westgard JO, Hunt MR:

Use and interpretation of common statistical tests in method-comparison studies, Clin Chem 19:49-57, 1973.

444 (Ventana-emergente - Popup)

Westgard JO, Hunt MR:

Use and interpretation of common statistical tests in method-comparison studies, Clin Chem 19:49-57, 1973.

445 (Ventana-emergente - Popup)

American Society for Testing and Materials:

ASTM Standard E178-68: standard recommended practice for dealing with outlying observations, Philadelphia, 1968, ASTM.

446 (Ventana-emergente - Popup)

Waakers PJM, Hellendoorn HBA, Op De Weegh GJ, Heerspink W: Applications of statistics in clinical chemistry: a critical evaluation of regression lines, Clin Chim Acta 64:173-184, 1975.

Cornbleet PJ, Gochman N:

Incorrect least-squares regression coefficients in method-comparison analysis, Clin Chem 25:432-438, 1979.

447 (Ventana-emergente - Popup)

Waakers PJM, Hellendoorn HBA, Op De Weegh GJ, Heerspink W: Applications of statistics in clinical chemistry: a critical evaluation of regression lines, Clin Chim Acta 64:173-184, 1975.

448 (Ventana-emergente - Popup)

Cornbleet PJ, Gochman N:

Incorrect least-squares regression coefficients in method-comparison analysis, Clin Chem 25:432-438, 1979.

449 (Ventana-emergente - Popup)

Cornbleet PJ, Gochman N:

Incorrect least-squares regression coefficients in method-comparison analysis, Clin Chem 25:432-438, 1979.

450 (Ventana-emergente - Popup)

Westgard JO, Carey RN, Wold S:

Criteria for judging precision and accuracy in method development and evaluation, Clin Chem 20:825-833, 1974.

451 (Ventana-emergente - Popup)

Natrella MG:

Experimental statistics, National Bureau of Standards Handbook 91, Washington,



D.C., 1963, US Government Printing Office.

452 (Ventana-emergente - Popup)

National Committee for Clinical Laboratory Standards: NCCLS proposed guideline EP5-T2, Proposed guidelines for user evaluation of precision performance of clinical chemistry devices, Subcommittee for User Evaluation of Precision of the Evaluation Protocols Area Committee, Villanova, Penn., 1992, NCCLS.

453 (Ventana-emergente - Popup)

National Committee for Clinical Laboratory Standards: NCCLS proposed guideline EP6-P, Evaluation of the linearity of quantitative analytical methods, Subcommittee on Linearity Performance of the Evaluation Protocols Area Committee, Villanova, Penn., 1986, NCCLS.

454 (Ventana-emergente - Popup)

National Committee for Clinical Laboratory Standards: NCCLS proposed guideline EP7-P, Interference testing in clinical chemistry, Subcommittee on Interference Testing of the Evaluation Protocols Area Committee, Villanova, Penn., 1986, NCCLS.

455 (Ventana-emergente - Popup)

National Committee for Clinical Laboratory Standards:

NCCLS proposed guideline EP9-T, User comparison of quantitative clinical laboratory methods using patient samples, Subcommittee on User Comparison of Methods of the Evaluation Protocols Area Committee, Villanova, Penn., 1993, NCCLS.

456 (Ventana-emergente - Popup)

Krouwer J:

A multifactor experimental design for evaluating random access analyzers, Clin Chem 34:1984-1986, 1988.

457 (Ventana-emergente - Popup)

National Committee for Clinical Laboratory Standards: NCCLS tentative guideline EP10-T, preliminary evaluation of quantitative clinical methods, ed 2, tentative guideline, Evaluation Protocols Area Committee, Villanova, Penn., 1993, NCCLS.

458 (Ventana-emergente - Popup)

Waakers PJM, Hellendoorn HBA, Op De Weegh GJ, Heerspink W: Applications of statistics in clinical chemistry: a critical evaluation of regression lines, Clin Chim Acta 64:173-184, 1975.

Cornbleet PJ, Gochman N:

Incorrect least-squares regression coefficients in method-comparison analysis, Clin Chem 25:432-438, 1979.

459 (Ventana-emergente - Popup)

Passing H, Bablock W:

Comparison of several regression procedures for method comparison studies and determination of sample sizes, J Clin Chem Clin Biochem 22:431-445, 1984.

460 (Ventana-emergente - Popup)

Barnett RN:

Medical significance of laboratory results, Am J Clin Pathol 50:671-676, 1968.

Barnett RN:

Analytic goals in clinical chemistry: the pathologist's viewpoint. In Elevitch FR, editor:



Proceedings of the 1976 Aspen conference on analytic goals in clinical chemistry, Skokie, Ill., 1977, College of American Pathologists, pp 20-24.

461 (Ventana-emergente - Popup)

Ehrmeyer SS, Laessig RH, Leinweber JE, Oryall JJ:

1990 Medicare/CLIA final rules for proficiency testing: minimum intralaboratory performance characteristics (CV and bias) needed to pass, *Clin Chem* 36:1736-1740, 1990.

Westgard JO, Burnett RW:

Precision requirements for cost-effective operation of analytical processes, *Clin Chem* 36:1629-1632, 1990.

462 (Ventana-emergente - Popup)

Fraser CG:

The application of theoretical goals based upon biological variation in proficiency testing, *Arch Pathol Lab Med* 112:404-415, 1988.

Fraser CG:

Desirable standards of performance for therapeutic drug monitoring, *Clin Chem* 33:387-389, 1987.

Fraser CG, Petersen PH, Ricos C, Haeckel R:

Quality specifications. In Haeckel R, editor: *Evaluation methods in laboratory medicine*, New York, 1993, VCH Publishers.

463 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Glick MR:

Ohio Valley Section Meeting on "Interferences," Cincinnati, Ohio, Feb 27, 1988.

464 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Kaplan LA:

Ohio Valley Section Meeting on "Interferences," Cincinnati, Ohio, Feb 27, 1988.

465 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Glick MR, Ryder KW:

Interferographs: user's guide to interferences in clinical chemistry instruments, Indianapolis, 1987, Science Enterprises, Inc.

466 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Allen E, Rieman W:

Determining only one compound in a mixture, short spectrophotometric method, *Anal Chem* 25:1325-1331, 1953.

467 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Soldin SJ, Henderson L, Hill JG:

The effect of bilirubin and ketones on reaction rate methods for the measurement of creatinine, *Clin Biochem* 11:82-86, 1978.

468 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Pesce AJ, Michael JG:

Artifacts and limitations of enzyme immunoassay, *J Immunol Methods* 150:111-119, 1992.

469 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Freer DE, Statland BE:

The effect of ethanol (0.75 g/kg body weight) on the activities of selected enzymes in sera of healthy young adults. I. Intermediate-term effect, *Clin Chem* 23:830-834, 1977.

470 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)



Kaplan LA:

Ohio Valley Section Meeting on "Interferences," Cincinnati, Ohio, Feb 27, 1988.

471 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Young DS, Pestaner LC, Gibberman V:

Effects of drugs on clinical laboratory tests, *Clin Chem* 21:1D-432D, 1975.

472 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Young DS:

Effects of drugs on clinical laboratory tests, ed 3, Washington, D.C., 1990, American Association for Clinical Chemistry.

Young DS:

1991 supplement to the effects of drugs on clinical laboratory tests, Washington, D.C., 1991, American Association for Clinical Chemistry.

473 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Friedman RB, Anderson RE, Entine SM, Hirshberg SB:

Effect of diseases on clinical laboratory tests, *Clin Chem* 26:1D-476D, 1980.

474 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Friedman KB, Young DS,

Effect of diseases on clinical laboratory tests, ed 2, Washington, D.C., 1989, American Association for Clinical Chemistry.

475 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Buttner R, Dorth R, Boutwell JH, et al:

International Federation of Clinical Chemistry expert panel on nomenclature and principles of quality control in clinical chemistry. Approved recommendation (1978). Part 2:

Assessment of analytical methods for routine use, *Clin Chim Acta* 98:129F-143F, 1979.

Galteaux MM, Siest G:

IFCC. Drug effects in clinical chemistry. Part 2: Guidelines for evaluation of an analytical interference, *J Clin Chem Clin Biochem* 22:275-279, 1984.

Interference testing in clinical chemistry; proposed guideline, NCCLS Publication EP7-P, Villanova, Penn., 1986, National Committee on Clinical Laboratory Standards.

Glick MR, Ryder KW, Jackson SA:

Graphical comparison of interferences in clinical chemistry instrumentation, *Clin Chem* 32:470-475, 1986.

476 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Glick MR, Ryder KW:

Interferographs: user's guide to interferences in clinical chemistry instruments, Indianapolis, 1987, Science Enterprises, Inc.

477 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Glick MR, Ryder KW, Jackson SA:

Graphical comparison of interferences in clinical chemistry instrumentation, *Clin Chem* 32:470-475, 1986.

478 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Castano-Vidriales JL: Interferences in clinical chemistry, *J Int Fed Clin Chem* 6:7-9, 1994.

479 (Ventana-emergente - Popup)

Goldstein RJ, Lichtenstein NS, Souder S: The myth of the low anion hiato, *JAMA* 243:1737-1738, 1980.

480 (Ventana-emergente - Popup)

Natelson S:



On the significance of the expression "anion hiato," Clin Chem 29:282-283, 1983.

481 (Ventana-emergente - Popup)

Berger R:

Anion hiato: low sensitivity or erroneous reference range? Crit Care Med 19:129-130, 1991.

Cembrowski GS, Westgard JO, Kurtczyk DFI:

Use of anion hiato for the quality control of electrolyte analyzers, Am J Clin Pathol 79:688, 1983.

Bockelman HW, Cembrowski GS, Kurtczyk DFI, et al: Quality control of electrolyte analyzers: evaluation of the anion hiato average, Am J Clin Pathol 81:219, 1984.

Winter SD, Pearson JR, Gabow PA, et al:

The fall of the serum anion hiato, Arch Intern Med 150:311, 1990.

482 (Ventana-emergente - Popup)

Winter SD, Pearson JR, Gabow PA, et al:

The fall of the serum anion hiato, Arch Intern Med 150:311, 1990.

483 (Ventana-emergente - Popup)

Emmett ME, Narins RG:

Clinical use of the anion hiato, Medicine 56:38-54, 1977.

Oh MS, Carroll WJ:

Current concepts: anion hiato, N Engl J Med 297:814-817, 1977.

484 (Ventana-emergente - Popup)

Mather A:

Chloride, direct mercurimetric titration (provisional). En Faulkner WR, Meites S, editores: Selected methods of clinical chemistry, Washington, D.C., 1982, American Association for Clinical Chemistry, vol 9, págs. 153-155.

485 (Ventana-emergente - Popup)

Levinson SS:

Chloride, colorimetric method. En Faulkner WR, Meites S, editores: Selected methods of clinical chemistry, Washington, D.C., 1982, American Association for Clinical Chemistry, vol 9, págs. 143-148.

486 (Ventana-emergente - Popup)

Dietz AA, Bond EE:

Chloride, coulometric-amperometric methods. En Faulkner WR, Meites S, editores: Selected methods of clinical chemistry, Washington, D.C., 1982, American Association for Clinical Chemistry, vol 9, págs. 149-52.

487 (Ventana-emergente - Popup)

Ono T, Taniguchi J, Mitsumaki H, et al:

A new enzymatic assay of chloride in serum, Clin Chem 34:552- 553, 1988.

488 (Ventana-emergente - Popup)

Emancipator K, Kroll MH:

Bromide interference: Is less really better? Clin Chem 36:1470-1473, 1990.

489 (Ventana-emergente - Popup)

Ono T, Taniguchi J, Mitsumaki H, et al:

A new enzymatic assay of chloride in serum, Clin Chem 34:552- 553, 1988.



490 (Ventana-emergente - Popup)

Emancipator K, Kroll MH:

Bromide interference: Is less really better? Clin Chem 36:1470-1473, 1990.

491 (Ventana-emergente - Popup)

Kayne FJ:

Osmolality: review of methods, American Society of Clinical Pathologists, Check Sample, vol 9, no 7, Chicago, 1993; PTS 93-7 (PTS-73).

492 (Ventana-emergente - Popup)

Kayne FJ:

Osmolality: review of methods, American Society of Clinical Pathologists, Check Sample, vol 9, no 7, Chicago, 1993; PTS 93-7 (PTS-73).

493 (Ventana-emergente - Popup)

Weisberg HF:

Osmolality-calculated "delta" and more formulas, Clin Chem 21:1182-1184, 1975.

494 (Ventana-emergente - Popup)

Berger R:

Anion hiato: low sensitivity or erroneous reference range? Crit Care Med 19:129-130, 1991.

495 (Ventana-emergente - Popup)

Dorwart WV, Chalmers L:

Comparison of methods for calculating serum osmolality from chemical concentrations, and the prognostic value of such calculations, Clin Chem 21:190-194, 1975.

496 (Ventana-emergente - Popup)

Bhagat CI, Garcia-Webb P, Fletcher E, Beilby JP: Calculated vs. measured plasma osmolalities revisited, Clin Chem 30:1703-1705, 1985.

497 (Ventana-emergente - Popup)

Loeb JN:

The hyperosmolar state, N Engl J Med 290: 1184-1187, 1974.

498 (Ventana-emergente - Popup)

Weissman N, Pilegg VJ:

Inorganic ions. In Henry RJ, Cannon DC, Winkelman JW, editors: Clinical chemistry principles and techniques, New York, 1974, Harper & Row.

499 (Ventana-emergente - Popup)

Weissman N, Pilegg VJ:

Inorganic ions. In Henry RJ, Cannon DC, Winkelman JW, editors: Clinical chemistry principles and techniques, New York, 1974, Harper & Row.

500 (Ventana-emergente - Popup)

Ladenson JH, Apple FS, Aguanno JJ, Koch DD: Sodium measurements in multiple myeloma: two techniques compared, Clin Chem 28:2383-2386, 1982.

501 (Ventana-emergente - Popup)

Ladenson JH, Apple FS, Aguanno JJ, Koch DD: Sodium measurements in multiple myeloma: two techniques compared, Clin Chem 28:2383-2386, 1982.

502 (Ventana-emergente - Popup)

Sumiyoshi H, Nakahara K, Ueno K:



New convenient colorimetric determination of potassium in blood serum, Talanta 24:763-765, 1977.

503 (Ventana-emergente - Popup)

Kumar A, Chapoteau E, Czech BP, et al: Chromogenic ionophore-based methods for spectrophotometric assay of sodium and potassium in serum and plasma, Clin Chem 34:1709-1712, 1988.

504 (Ventana-emergente - Popup)

Berry MN, Mazzachi RD, Pejakovic M, Peake MJ: Enzymatic determination of sodium in serum, Clin Chem 34:2295-2298, 1988.

505 (Ventana-emergente - Popup)

Berry MN, Mazzachi RD, Pejakovic M, Peake MJ: Enzymatic determination of potassium in serum, Clin Chem 35:817-820, 1989.

506 (Ventana-emergente - Popup)

Rem J, Siggard-Andersen O, Norgard-Pedersen B, Sorensen S: Hemoglobin pigments: photometer for oxygen saturation, carboxyhemoglobin, and methemoglobin in capillary blood, Clin Chim Acta 42:101, 1972.

507 (Ventana-emergente - Popup)

Burnett RW, Covington AK, Fogh-Andersen N, et al:

Recommendations on wholeblood sampling, transport, and storage for simultaneous determination of pH, blood gases, and electrolytes. J Int Fed Clin Chem 6:115-120, 1994.

Siggard-Andersen O:

In The acid-base status of the blood, ed 4, Copenhagen, 1974, Munksgaard, p 152.

508 (Ventana-emergente - Popup)

Rosenberg E, Price N:

Diffusion of CO₂ and O₂ through the walls of plastic syringes, Clin Chem 37:1244-1248, 1991.

Mahoney JJ, Harvey JA, Wong RJ, Van Kessel AL: Changes in oxygen measurements when whole blood is stored in iced plastic or glass syringes, Clin Chem 37:1244-1248, 1991.

509 (Ventana-emergente - Popup)

Mahoney JJ, Harvey JA, Wong RJ, Van Kessel AL: Changes in oxygen measurements when whole blood is stored in iced plastic or glass syringes, Clin Chem 37:1244-1248, 1991.

Hilty H, Karendal B:

Effect of syringe material on oxygen tension in stored blood, Acta Soc Upsal 193-205, 1969.

510 (Ventana-emergente - Popup)

Burnett RW, Covington AK, Fogh-Andersen N, et al:

Recommendations on wholeblood sampling, transport, and storage for simultaneous determination of pH, blood gases, and electrolytes. J Int Fed Clin Chem 6:115-120, 1994.

511 (Ventana-emergente - Popup)

Natelson S:



Routine use of ultramicro methods in the clinical laboratory, AmJ Clin Pathol 21:1153-1172, 1951.

Meites S, Faulkner WR:

Manual of practical micro and general procedures in clinical chemistry, Springfield, Ill., 1961, Charles C Thomas.

512 (Ventana-emergente - Popup)

Skeggs LT Jr:

An automatic method for the determination of carbon dioxide in blood plasma, Am J Clin Pathol 33:181-185, 1960.

513 (Ventana-emergente - Popup)

Ungerer JP, Ungerer MJ, Vermaak JH: Discordance between measured and calculated total carbon dioxide, Clin Chem 36:2093-2096, 1990.

514 (Ventana-emergente - Popup)

Hochella NJ, Weinhouse S:

Automated lactic acid determination in serum and tissue extracts, Anal Biochem 10:304, 1965.

Barker SB:

Lactic acid. In Seligson D, editor: Standard methods of clinical chemistry, New York, 1961, Academic Press, vol 3.

515 (Ventana-emergente - Popup)

Long C:

The stabilization and estimation of lactic acid in blood samples, Biochem J 40:27, 1946.

516 (Ventana-emergente - Popup)

Savory J, Kaplan A:

A gas chromatographic method for the determination of lactic acid in blood, Clin Chem 12:559-569, 1966.

517 (Ventana-emergente - Popup)

Ronzoni E, Wallen-Lawrence Z: Determination of lactic acid in blood, J Biol Chem 74:363-377, 1927.

518 (Ventana-emergente - Popup)

Schneyer J:

Eine methode zur quantitativen Milchsäurebestimmung im Harn, Biochem Z 70:294, 1915.

519 (Ventana-emergente - Popup)

Avery BF, Hastings AB:

A gasometric method for the determination of lactic acid in the blood, J Biol Chem 94:273-280, 1931.

520 (Ventana-emergente - Popup)

Kaplan LA, Gau N, Stein EA:

Collection and storage of serum lactic acid samples at room temperature without deproteinization, Clin Chem 26:175-176, 1980.

521 (Ventana-emergente - Popup)

Astles R, Williams CP, Sedor F:



Stability of plasma lactate in vitro in the presence of antiglycolytic agents, *Clin Chem* 40:1327- 1330, 1994.

522 (Ventana-emergente - Popup)

Kiechle FL:

Lactate: review of methods, ASCP check sample volume 8, no 7, PTS 92-7 (PTS-65), American Society of Clinical Pathologists.

523 (Ventana-emergente - Popup)

Friedmann TE, Haugen GE, Kmiecik TC: Pyruvic acid III, *J Biol Chem* 157:673-689, 1945.

524 (Ventana-emergente - Popup)

Glasser L:

Body fluids III: tapping the wealth of information in CSF, *DiagnMed*, pp 23-33, Jan-Feb 1981.

525 (Ventana-emergente - Popup)

Bonora R, Pagani F, Panteghini M: Pyruvate measured in whole blood with the Cobas Bio analyzer, *Clin Chem* 35:325, 1989.

526 (Ventana-emergente - Popup)

Hansen JL, Freier EF:

Direct assays of lactate, pyruvate, β -hydroxybutyrate and acetoacetate with a centrifugal analyzer, *Clin Chem* 24:475-479, 1978.

527 (Ventana-emergente - Popup)

Chariot P, Ratiney R, Ammi-Said M, et al: Optimal handling of blood samples for routine measurement of lactate and pyruvate, *Arch Pathol Lab Med* 118:695-697, 1994.

528 (Ventana-emergente - Popup)

Mascini M, Mazzei F, Moscone D, et al: Lactate and pyruvate electrochemical biosensors for whole blood in extracorporeal experiments with an endocrine artificial pancreas, *Clin Chem* 33:591-593, 1987.

529 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Marbach EP, Weil MH.

Rapid enzymatic measurement of blood lactate and pyruvate. *Clin Chem* 1967; 13: 314-325.

530 (Ventana-emergente - Popup)

Kokko JP:

Renal concentrating and diluting mechanism, *Hosp Pract* 14:110-116, 1979.

Schrier RW:

Renal and electrolyte disorders, ed 3, Boston, 1986, Little, Brown & Co.

531 (Ventana-emergente - Popup)

Kokko JP:

Renal concentrating and diluting mechanism, *Hosp Pract* 14:110-116, 1979.

Schrier RW:

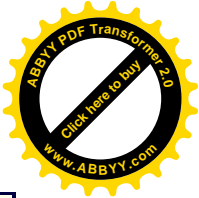
Renal and electrolyte disorders, ed 3, Boston, 1986, Little, Brown & Co.

532 (Ventana-emergente - Popup)

Peart WS:

Renin-angiotensin system, *N Engl J Med* 292:302-306, 1975.

Rose BD:



Pathophysiology of renal disease, New York, 1981, McGraw-Hill, pp 579-585.

533 (Ventana-emergente - Popup)

MacKnight ADC:

Epithelial transport of potassium, *Kidney Int* 11:391-414, 1977.

534 (Ventana-emergente - Popup)

Suki WN:

Disposition and regulation of body potassium: an overview, *Am J Med Sci* 272:31-41, 1976.

535 (Ventana-emergente - Popup)

Suki WN:

Disposition and regulation of body potassium: an overview, *Am J Med Sci* 272:31-41, 1976.

Giebisch G, Malnic G, Berliner RW:

Renal transport and control of potassium excretion. In 8. Brenner BM, Rector FC, editors: *The kidney*, Philadelphia, 1991, Saunders.

536 (Ventana-emergente - Popup)

Massry SG, Friedler RM, Coburn JW:

Excretion of phosphate and calcium, *Arch Intern Med* 131:828-859, 1973.

537 (Ventana-emergente - Popup)

Massry SG, Friedler RM, Coburn JW:

Excretion of phosphate and calcium, *Arch Intern Med* 131:828-859, 1973.

Agus ZS, Gardner LB, Beck LH, Goldberg M:

Effects of parathyroid hormone on renal tubular reabsorption of calcium, sodium, and phosphate, *Am J Physiol* 224:1143-1148, 1973.

538 (Ventana-emergente - Popup)

Slatopolsky E, Robson AM, Elkan I, Bricker NS: Control of phosphate excretion in uremic man, *J Clin Invest* 47:1865-1874, 1968.

539 (Ventana-emergente - Popup)

Contiguglia SR, Alfrey AC, Miller N, Butkus D: Total-body magnesium excess in chronic renal failure, *Lancet* 1:1300-1302, 1972.

540 (Ventana-emergente - Popup)

Richardson RMA, Goldstein MB, Stinebaugh BJ, Halperin ML: Influence of diet and metabolism on urinary acid secretion in the rat and the rabbit, *J Lab Clin Med* 94:510-518, 1979.

541 (Ventana-emergente - Popup)

Flessner MF, Knepper MA:

Renal acid-base transport. In Schrier RW, Gottchalk CW, editors: *Diseases of the kidney*, Boston, 1993, Little, Brown & Co.

542 (Ventana-emergente - Popup)

Flessner MF, Knepper MA:

Renal acid-base transport. In Schrier RW, Gottchalk CW, editors: *Diseases of the kidney*, Boston, 1993, Little, Brown & Co.



543 (Ventana-emergente - Popup)

Flessner MF, Knepper MA:

Renal acid-base transport. In Schrier RW, Gottchalk CW, editors: Diseases of the kidney, Boston, 1993, Little, Brown & Co.

544 (Ventana-emergente - Popup)

Flessner MF, Knepper MA:

Renal acid-base transport. In Schrier RW, Gottchalk CW, editors: Diseases of the kidney, Boston, 1993, Little, Brown & Co.

545 (Ventana-emergente - Popup)

First MR:

Chronic renal failure, Garden City, N.Y., 1982, Medical Examining Publishing Co, pp 1-5, 15-18.

546 (Ventana-emergente - Popup)

Perrone RD, Madias NE, Levey AS: Serum creatinine as an index of renal function: new insights into old concepts, Clin Chem 38:1933-1953, 1992.

547 (Ventana-emergente - Popup)

Stein JH:

Hormones and the kidney, Hosp Pract 14:91-105, 1979.

548 (Ventana-emergente - Popup)

Stein JH:

Hormones and the kidney, Hosp Pract 14:91-105, 1979.

549 (Ventana-emergente - Popup)

Eschbach JW, Adamson JW, Cook JB: Disorders of red blood cell production in uremia, Arch Intern Med 26:812-815, 1970.

550 (Ventana-emergente - Popup)

Pesce AJ, First MR:

Proteinuria: an integrated review, New York, 1979, Marcel Dekker, pp 80-99, 100-143.

551 (Ventana-emergente - Popup)

Pesce AJ, First MR:

Proteinuria: an integrated review, New York, 1979, Marcel Dekker, pp 80-99, 100-143.

552 (Ventana-emergente - Popup)

Pesce AJ, First MR:

Proteinuria: an integrated review, New York, 1979, Marcel Dekker, pp 80-99, 100-143.

553 (Ventana-emergente - Popup)

Perlmann GE, Tamm I, Horsfall FL:

An electrophoretic examination of a urinary mucoprotein which reacts with various viruses, J Exp Med 95:99-104, 1952.

554 (Ventana-emergente - Popup)

Coe FL:

Clinical and laboratory assessment of the patient with renal disease. In Brenner BM, Rector FC, editors: The kidney, vol 1, Philadelphia, 1986, Saunders.



555 (Ventana-emergente - Popup)

Pesce AJ, First MR:

Proteinuria: an integrated review, New York, 1979, Marcel Dekker, pp 80-99, 100-143.

556 (Ventana-emergente - Popup)

Madias NE, Perrone RD:

Acid-base disorders in association with renal disease. In Schrier RW, Gottschalk CW, editors: Disease of the kidney, Boston, 1993, Little, Brown & Co.

557 (Ventana-emergente - Popup)

Coe FL:

Clinical and laboratory assessment of the patient with renal disease. In Brenner BM, Rector FC, editors: The kidney, vol 1, Philadelphia, 1986, Saunders.

558 (Ventana-emergente - Popup)

First MR, Pollak VE:

Renal insufficiency in the diabetic patient with heart disease. In Scott RC, editor: Clinical cardiology and diabetes, vol 3, part 2, Mount Kisco, N.Y., 1981, Futura Publishing.

559 (Ventana-emergente - Popup)

Viberti GC, Keen H:

The patterns of proteinuria in diabetes mellitus: relevance to pathogenesis and prevention of diabetic nephropathy, Diabetes 33:686-692, 1984.

560 (Ventana-emergente - Popup)

Wiegmann TB, Chonko AM, McDougall ML, Moore WV:

The role of disease duration and hypertension in albumin excretion of type I diabetes mellitus, J Am Soc Nephrol 2:1587-1592, 1992.

561 (Ventana-emergente - Popup)

Mogensen CE, Christensen CK:

Predicting diabetic nephropathy in insulin- dependent patients, N Engl J Med 311:356-360, 1984.

Mathiesen ER, Ronn B, Jensen T, et al:

Relationship between blood pressure and urinary albumin excretion in development of microalbuminuria, Diabetes 39:245-249, 1990.

562 (Ventana-emergente - Popup)

First MR:

Chronic renal failure, Garden City, N.Y., 1982, Medical Examining Publishing Co, pp 1-5, 15-18.

563 (Ventana-emergente - Popup)

First MR:

Chronic renal failure, Garden City, N.Y., 1982, Medical Examining Publishing Co, pp 1-5, 15-18.

564 (Ventana-emergente - Popup)

First MR:

Chronic renal failure, Garden City, N.Y., 1982, Medical Examining Publishing Co, pp 1-5, 15-18.

565 (Ventana-emergente - Popup)



Ware F:

Renal function tests: a guide to interpretation, Hosp Med 9:77-92, 1981.

566 (Ventana-emergente - Popup)

Perrone RD, Madias NE, Levey AS: Serum creatinine as an index of renal function: new insights into old concepts, Clin Chem 38:1933-1953, 1992.

567 (Ventana-emergente - Popup)

Perrone RD, Madias NE, Levey AS: Serum creatinine as an index of renal function: new insights into old concepts, Clin Chem 38:1933-1953, 1992.

568 (Ventana-emergente - Popup)

Cockcroft DW, Gault MH: Prediction of creatinine clearance from serum creatinine, Nephron 16:31-41, 1976.

569 (Ventana-emergente - Popup)

Perrone RD, Madias NE, Levey AS: Serum creatinine as an index of renal function: new insights into old concepts, Clin Chem 38:1933-1953, 1992.

570 (Ventana-emergente - Popup)

Ware F:

Renal function tests: a guide to interpretation, Hosp Med 9:77-92, 1981.

571 (Ventana-emergente - Popup)

Ware F:

Renal function tests: a guide to interpretation, Hosp Med 9:77-92, 1981.

572 (Ventana-emergente - Popup)

Ware F:

Renal function tests: a guide to interpretation, Hosp Med 9:77-92, 1981.

573 (Ventana-emergente - Popup)

Ware F:

Renal function tests: a guide to interpretation, Hosp Med 9:77-92, 1981.

574 (Ventana-emergente - Popup)

Harrington JT:

Evaluation of serum and urinary electrolytes, Hosp Pract 17:28-39, 1982.

575 (Ventana-emergente - Popup)

Harrington JT:

Evaluation of serum and urinary electrolytes, Hosp Pract 17:28-39, 1982.

576 (Ventana-emergente - Popup)

Oken DE:

On the differential diagnosis of acute renal failure, Am J Med 71:916-920, 1981.

577 (Ventana-emergente - Popup)

Harrington JT:

Evaluation of serum and urinary electrolytes, Hosp Pract 17:28-39, 1982.

578 (Ventana-emergente - Popup)

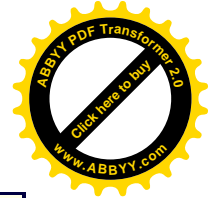
Harrington JT:

Evaluation of serum and urinary electrolytes, Hosp Pract 17:28-39, 1982.

579 (Ventana-emergente - Popup)

Harrington JT:

Evaluation of serum and urinary electrolytes, Hosp Pract 17:28-39, 1982.



580 (Ventana-emergente - Popup)

Slatopolsky E, Robson AM, Elkan I, Bricker NS: Control of phosphate excretion in uremic man, J Clin Invest 47:1865-1874, 1968.

Haussler MR, McCain TA:

Basic and clinical concepts related to vitamin D metabolism and action, N Engl J Med 297:974-983, 1041-1050, 1977.

581 (Ventana-emergente - Popup)

Pesce AJ, First MR:

Proteinuria: an integrated review, New York, 1979, Marcel Dekker, pp 80-99, 100-143.

582 (Ventana-emergente - Popup)

Pesce AJ, First MR:

Proteinuria: an integrated review, New York, 1979, Marcel Dekker, pp 80-99, 100-143.

583 (Ventana-emergente - Popup)

Pesce AJ, First MR:

Proteinuria: an integrated review, New York, 1979, Marcel Dekker, pp 80-99, 100-143.

584 (Ventana-emergente - Popup)

Pesce AJ, First MR:

Proteinuria: an integrated review, New York, 1979, Marcel Dekker, pp 80-99, 100-143.

585 (Ventana-emergente - Popup)

Eschbach JW, Adamson JW, Cook JB: Disorders of red blood cell production in uremia, Arch Intern Med 26:812-815, 1970.

586 (Ventana-emergente - Popup)

Eschbach JW, Adamson JW, Cook JB: Disorders of red blood cell production in uremia, Arch Intern Med 26:812-815, 1970.

587 (Ventana-emergente - Popup)

Jaffe M.:

Ueber den Niederschlag welchen Pikrinsäure in normalen Harn erzeugt und über eine neue Reaction des Kreatinins, Z Physiol Chem 10:391-400, 1886.

588 (Ventana-emergente - Popup)

Folin O:

On the determination of creatinine and creatine in blood, milk and tissues, J Biol Chem 17:475-481, 1914.

589 (Ventana-emergente - Popup)

Perrone RD, Madias NE, Levey AS: Serum creatinine as an index of renal function: new insights into old concepts, Clin Chem 38:1933-1953, 1992.

590 (Ventana-emergente - Popup)

Weber JA, van Zanten AP:

Interferences in current methods for measurement of creatinine, Clin Chem 37:965-700, 1991.

Swain RR, Briggs SL:



Positive interference with the Jaffe reaction by cephalosporin antibiotics, Clin Chem 23:1340-1342, 1977.

591 (Ventana-emergente - Popup)

Weber JA, van Zanten AP:

Interferences in current methods for measurement of creatinine, Clin Chem 37:965-700, 1991.

592 (Ventana-emergente - Popup)

Perrone RD, Madias NE, Levey AS:

Serum creatinine as an index of renal function: new insights into old concepts, Clin Chem 38:1933-1953, 1992.

Rajs G, Mayer M:

Oxidation markedly reduces bilirubin interference in the Jaffe creatinine assay, Clin Chem 38:2411-2413, 1992.

593 (Ventana-emergente - Popup)

Dilena BA:

Bacterial interference with measurement of creatinine in stored plasma, Clin Chem 34:1007-1008, 1988.

594 (Ventana-emergente - Popup)

Haeckel R:

Assay of creatinine in serum with use of fuller's earth to remove interferents, Clin Chem 27:179-183, 1981.

595 (Ventana-emergente - Popup)

Weber JA, van Zanten AP: Interferences in current methods for measurement of creatinine, Clin Chem 37:965-700, 1991.

596 (Ventana-emergente - Popup)

Kodak Ektachem clinical chemistry slides (CREA), test methodology sheet, pub no MP2-49 (revision 1992), Rochester, N.Y., 1992, Eastman Kodak Co.

597 (Ventana-emergente - Popup)

Tanganelli E, Prencipe L, Bassi D, et al: Enzymic assay of creatinine in serum and urine with creatinine iminohydrolase and glutamate dehydrogenase, Clin Chem 28:1461-1464, 1982.

598 (Ventana-emergente - Popup)

Thompson H, Rechnitz GA:

Ion electrode-based enzymatic analysis of creatinine, Anal Chem 46:246-249, 1974.

599 (Ventana-emergente - Popup)

Zhiri A, Houot O, Wellman-Bednawska M, Siest G:

Simultaneous determination of uric acid and creatinine in plasma by reversed-phase liquid chromatography, Clin Chem 31:109-112, 1985.

Rosano TG, Ambrose RT, Wu AHB, et al:

Candidate reference method for determining creatinine in serum: method development and interlaboratory validation, Clin Chem 36:1951-1955, 1990.

600 (Ventana-emergente - Popup)

Delanghe J, Slypere JPD, Buyzere MD, et al: Normal reference values for creatine, creatinine, and carnitine are lower in vegetarians, Clin Chem 35:1802-1803, 1989.



601 (Ventana-emergente - Popup)

Tiffany TO, Jansen JM, Burtis CA, et al: Enzymatic kinetic rate and endpoint analysis of substrate, by use of a GeMSAEC fast analyzer, Clin Chem 18:829-840, 1972.

602 (Ventana-emergente - Popup)

Harrison SP:

Interference in coupled-enzyme assay of urea nitrogen by excess endogenous enzyme, Clin Chem 39:911, 1993.

603 (Ventana-emergente - Popup)

Ohkubo A, Kamei S, Yamanaka M, et al: Multilayer-film analysis for urea nitrogen in blood, serum, or plasma, Clin Chem 30:1222-1225, 1984.

Hammond BR, Lester E:

Evaluation of a reflectance photometric method for determination of urea in blood, plasma, or serum, Clin Chem 30:596-597, 1984.

604 (Ventana-emergente - Popup)

Ohkubo A, Kamei S, Yamanaka M, et al: Multilayer-film analysis for urea nitrogen in blood, serum, or plasma, Clin Chem 30:1222-1225, 1984.

605 (Ventana-emergente - Popup)

Hammond BR, Lester E:

Evaluation of a reflectance photometric method for determination of urea in blood, plasma, or serum, Clin Chem 30:596-597, 1984.

606 (Ventana-emergente - Popup)

Chin WT, Kroontje W: Conductivity method for determination of urea, Anal Chem 33:1757-1760, 1961.

607 (Ventana-emergente - Popup)

Gourmelin Y, Gouget B, Truchaud A: Electrode measurement of glucose and urea in undiluted samples, Clin Chem 36:1646-1649, 1990.

608 (Ventana-emergente - Popup)

Folin O:

An improved method for the determination of uric acid in blood, J Biol Chem 86:179-187, 1930.

609 (Ventana-emergente - Popup)

Feichtmeier TV, Wrenn HT:

Direct determination of uric acid using uricase, Am J Clin Pathol 25:833-839, 1955.

610 (Ventana-emergente - Popup)

Marymount JH, London M:

Analyses performed with heat-coagulated blood and serum. VI. Direct determination of urates by means of o-dianisidine oxidation, Am J Clin Pathol 42:630-633, 1964.

611 (Ventana-emergente - Popup)

Gochman N, Schmitz JM:

Automated determination of uric acid, with use of a uricase- peroxidase system, Clin Chem 17:1154-1159, 1971.

612 (Ventana-emergente - Popup)

Fossati P, Prencipe L, Berti G:



Use of 3,5-dichloro-2-hydroxy- benzenesulfonic acid/4-aminophenazone chromogenic system in direct enzymatic assay of uric acid in serum and urine, Clin Chem 26:227-231, 1980.

613 (Ventana-emergente - Popup)

Haeckel R:

The use of aldehyde dehydrogenase to determine H₂O₂-producing reactions. I. The determination of the uric acid concentration, J Clin Chem Clin Biochem 14:101-107, 1976.

614 (Ventana-emergente - Popup)

Bell R, Ray RA:

A rate-sensing approach to the measurement of uric acid in serum and urine, Clin Chem 17:644, 1971.

615 (Ventana-emergente - Popup)

Pachla LA, Kissinger PT:

Measurement of serum uric acid by liquid chromatography, Clin Chem 25:1847-1852, 1979.

616 (Ventana-emergente - Popup)

Hausen A, Fuchs D, Konig K, Wachter H: Quantitation of urinary uric acid by reversed-phase liquid chromatography, Clin Chem 27:1455-1456, 1981.

617 (Ventana-emergente - Popup)

Pachla LA, Kissinger PT:

Measurement of serum uric acid by liquid chromatography, Clin Chem 25:1847-1852, 1979.

618 (Ventana-emergente - Popup)

Hohnadel DC, Koller A:

Urine protein, total. In Pesce AJ, Kaplan LA, editors: Methods in clinical chemistry, St. Louis, 1987, Mosby.

619 (Ventana-emergente - Popup)

Hohnadel DC, Koller A:

Urine protein, total. In Pesce AJ, Kaplan LA, editors: Methods in clinical chemistry, St. Louis, 1987, Mosby.

620 (Ventana-emergente - Popup)

Beilby JP, O'Leary BA:

α 1-Acid glycoprotein decreases recovery of total protein in urine when trichloroacetic acid is used to precipitate the proteins, Clin Chem 36:565-567, 1990.

621 (Ventana-emergente - Popup)

Hohnadel DC, Koller A:

Urine protein, total. In Pesce AJ, Kaplan LA, editors: Methods in clinical chemistry, St. Louis, 1987, Mosby.

Lievens MM, Celis PJ:

Drug interference in turbidimetry and colorimetry of proteins in urine, Clin Chem 28:2328, 1982 (Letter).

622 (Ventana-emergente - Popup)

Hohnadel DC, Koller A:

Urine protein, total. In Pesce AJ, Kaplan LA, editors: Methods in clinical chemistry, St. Louis, 1987, Mosby.



623 (Ventana-emergente - Popup)

Koumantakis G, Wyndham L:

Fluorescein interference with urinary creatinine and protein measurements, Clin Chem 37:1799, 1991.

624 (Ventana-emergente - Popup)

Hohnadel DC, Koller A:

Urine protein, total. In Pesce AJ, Kaplan LA, editors: Methods in clinical chemistry, St. Louis, 1987, Mosby.

625 (Ventana-emergente - Popup)

Hohnadel DC, Koller A:

Urine protein, total. In Pesce AJ, Kaplan LA, editors: Methods in clinical chemistry, St. Louis, 1987, Mosby.

626 (Ventana-emergente - Popup)

Koumantakis G, Wyndham L:

Fluorescein interference with urinary creatinine and protein measurements, Clin Chem 37:1799, 1991.

627 (Ventana-emergente - Popup)

Orsonneau JL, Douet P, Massoubre C, et al: An improved pyrogallol red\Nmolymdate method for determining total urinary protein, Clin Chem 35:2233-2236, 1989.

628 (Ventana-emergente - Popup)

van Ingen HE:

Automated analysis for urinary protein by pyrogallol red\ Nmolymdate method, Clin Chem 36:702, 1990.

629 (Ventana-emergente - Popup)

Waller KV, Ward KM, Mahan JD, Wismatt DK: Current concepts in proteinuria. Clin Chem 35:755-765, 1989.

630 (Ventana-emergente - Popup)

Lemann J Jr, Doumas BT:

Proteinuria in health and disease assessed by measuring the urinary protein/creatinine ratio, Clin Chem 33:297-299, 1987.

Ginsberg JM, Chang BS, Matarese RA, Garella S: Use of single voided urine samples to estimate quantitative proteinuria, N Engl J Med 309:1543-1546, 1983.

631 (Ventana-emergente - Popup)

Waller KV, Ward KM, Mahan JD, Wismatt DK:

Current concepts in proteinuria. Clin Chem 35:755-765, 1989.

Lemann J Jr, Doumas BT:

Proteinuria in health and disease assessed by measuring the urinary protein/creatinine ratio, Clin Chem 33:297-299, 1987.

Ginsberg JM, Chang BS, Matarese RA, Garella S:

Use of single voided urine samples to estimate quantitative proteinuria, N Engl J Med 309:1543-1546, 1983.

Cohen EP, Lemann J Jr:

The role of the laboratory in evaluation of kidney function, Clin Chem 37:785-796, 1991.



632 (Ventana-emergente - Popup)

Cohen EP, Lemann J Jr:

The role of the laboratory in evaluation of kidney function, Clin Chem 37:785-796, 1991.

633 (Ventana-emergente - Popup)

Johnson TR:

Development of the liver. In Johnson TR, Moore WM, Jefferies SE, editors: Children are different: developmental physiology, ed 2, Columbus, 1978, Ross Laboratories.

634 (Ventana-emergente - Popup)

Demers LM:

Serum bile acids in health and in hepatobiliary disease. In Demers LM, Shaw LM, editors:

635 (Ventana-emergente - Popup)

Demers LM:

Serum bile acids in health and in hepatobiliary disease. In Demers LM, Shaw LM, editors:

636 (Ventana-emergente - Popup)

Demers LM:

Serum bile acids in health and in hepatobiliary disease. In Demers LM, Shaw LM, editors:

637 (Ventana-emergente - Popup)

Stoner JW:

Neonatal jaundice, Am Fam Physician 24:226-232, 1981.

638 (Ventana-emergente - Popup)

Stoner JW:

Neonatal jaundice, Am Fam Physician 24:226-232, 1981.

639 (Ventana-emergente - Popup)

Stoner JW:

Neonatal jaundice, Am Fam Physician 24:226-232, 1981.

640 (Ventana-emergente - Popup)

Doumas BT, Wu FW:

The measurement of bilirubin fractions in serum, Crit Rev Clin Lab Sci 28:415-445, 1991.

641 (Ventana-emergente - Popup)

Craig JR:

Hepatitis delta virus, editorial, Am J Clin Pathol 98:552-555, 1992.

642 (Ventana-emergente - Popup)

Jeppson JO, Franzen B, Cox DW, et al:

Typing of genetic variants of alpha-1-antitrypsin by electrofocusing, Clin Chem 28:219-225, 1982.

643 (Ventana-emergente - Popup)

Ottobrelli A et al:



Patterns of delta virus reinfection and disease in liver transplantation, Gastroenterology 101:1649-1655, 1991.

Todo S, Fung JJ, Tzakis A, et al:

One hundred ten consecutive primary orthotopic liver transplants under FK-506 in adults, Transplant Proc 23:1397-1402, 1991.

644 (Ventana-emergente - Popup)

Imagawa DK, Millis JM, Olthoff KM, et al:

The role of tumor necrosis factor in allograft rejection. I. Evidence that elevated levels of tumor necrosis factor-alpha predict rejection following orthotopic liver transplantation, Transplantation 50:219-225, 1990.

645 (Ventana-emergente - Popup)

Ottobrelli A et al:

Patterns of delta virus reinfection and disease in liver transplantation, Gastroenterology 101:1649-1655, 1991.

646 (Ventana-emergente - Popup)

Ellis G, Goldberg DM, Spooner RJ, Ward AM:

Serum enzyme tests in diseases of the liver and biliary tree, Am J Clin Pathol 70:248-258, 1978.

647 (Ventana-emergente - Popup)

Friedman RB, Anderson RE, Entine SM, Hirschberg SB:

Effects of diseases on clinical laboratory tests, Clin Chem 26:1D-476D, 1980.

648 (Ventana-emergente - Popup)

Demers LM:

Serum bile acids in health and in hepatobiliary disease. In Demers LM, Shaw LM, editors: Demers LM: Serum bile acids in health and in hepatobiliary disease. In Demers LM, Shaw LM, editors: Evaluation of liver function, Baltimore, 1978, Urban & Schwarzenberg.

Friedman RB, Anderson RE, Entine SM, Hirschberg SB:

Effects of diseases on clinical laboratory tests, Clin Chem 26:1D-476D, 1980.

649 (Ventana-emergente - Popup)

Friedman RB, Anderson RE, Entine SM, Hirschberg SB:

Effects of diseases on clinical laboratory tests, Clin Chem 26:1D-476D, 1980.

650 (Ventana-emergente - Popup)

Lloyd-Still JD:

Disorders of the liver in childhood. In Demers LM, Shaw LM, editors: Evaluation of liver function, Baltimore, 1978, Urban & Schwarzenberg.

651 (Ventana-emergente - Popup)

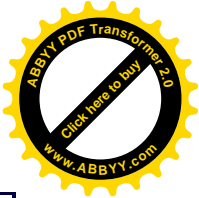
Ottobrelli A et al:

Patterns of delta virus reinfection and disease in liver transplantation, Gastroenterology 101:1649-1655, 1991.

652 (Ventana-emergente - Popup)

Nanji AA, Blank D:

The serum urea nitrogen/ creatinine ratio and liver disease, Clin Chem 28:1398-1399,



1982.

653 (Ventana-emergente - Popup)

Reitman S, Frankel S:

A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases, Am J Clin Pathol 28:56-63, 1957.

654 (Ventana-emergente - Popup)

Bretaudiere JP, Burtis C, Pasching J, et al:

Study of the alanine aminotransferase kinetic assay by response surface methodology, Clin Chem 26:1023, 1980.

655 (Ventana-emergente - Popup)

Wroblewski F, LaDue JS:

Serum glutamic-pyruvic transaminase in cardiac and hepatic disease, Proc Soc Exp Biol Med 91:569-571, 1956.

656 (Ventana-emergente - Popup)

Tietz NW, editor:

Clinical guide to laboratory tests, ed 2, Philadelphia, 1990, Saunders.

657 (Ventana-emergente - Popup)

Peters T Jr:

Serum albumin. In Putnam FW, editor: The plasma proteins, New York, 1975, Academic Press, vol 1.

658 (Ventana-emergente - Popup)

Block RJ, Weiss KW, Carroll DB:

In Block RJ, Weiss KW, editors: Amino acid handbook, Springfield, Ill., 1956, Charles C Thomas.

659 (Ventana-emergente - Popup)

Goldenberg H, Drewes PA:

Direct photometric determination of globulin in serum, Clin Chem 17:358-362, 1971.

660 (Ventana-emergente - Popup)

Gustafsson JEC:

Improved specificity of serum albumin determination and estimation of "acute phase reactants" by use of the bromocresol green reaction, Clin Chem 22:616-622, 1976.

661 (Ventana-emergente - Popup)

Maguire GA, Price CP:

Bromocresol purple method for serum albumin gives falsely low values in patients with renal insufficiency, Clin Chim Acta 155:83-88, 1986.

662 (Ventana-emergente - Popup)

Bush V, Reed RG:

Bromocresol purple dye-binding methods underestimate albumin that is carrying covalently bound bilirubin, Clin Chem 33:821-823, 1987.

663 (Ventana-emergente - Popup)

Stamp RJ:

Measurement of albumin in urine by end-point immunonephelometry, Ann Clin Biochem 25:442-443, 1988.

664 (Ventana-emergente - Popup)



Barlow IM, Harrison SP, Sykes MO: Immunospectrophotometric micro-albumin kit adapted to the Technicon RA-1000, Clin Chem 34:177-178, 1988.

665 (Ventana-emergente - Popup)

Jury DR, Speed JF, Dunn RJ:

Urinary albumin radioimmunoassay using a solid phase second antibody and solid phase iodination, Clin Chim Acta 148:63-67, 1979.

666 (Ventana-emergente - Popup)

Puri A, Casburn-Budd R, Eisen V, Slater JDH:

Simpler measurement of albumin in urine or plasma, Clin Chem 31:1241-1242, 1985.

Townsend JC:

A competitive immunoenzymatic assay for albumin in urine, Clin Chem 32:1372-1374, 1986.

667 (Ventana-emergente - Popup)

Watts GF, Bennett JE, Rowe DJ, et al. Assessment of immunological methods for determining low concentrations of albumin in urine, Clin Chem 32:1544-1548, 1986.

668 (Ventana-emergente - Popup)

Hallbach J, Hoffmann GE, Guder WG: Overestimation of albumin in heparinized plasma, Clin Chem 37:566-568, 1991.

669 (Ventana-emergente - Popup)

Duggan J, Duggan PF:

Albumin by bromocresol green: a case of laboratory conservatism, Clin Chem 28:1407-1408, 1982.

670 (Ventana-emergente - Popup)

MacNeil MLW, Mueller PW, Caudill SP, Steinberg KK: Considerations when measuring urinary albumin; precision, substances that may interfere, and conditions for sample storage, Clin Chem 37:2120-2123, 1991.

671 (Ventana-emergente - Popup)

Denko CW, Gabriel P:

Age and sex-related levels of albumin, ceruloplasmin, α_1 -antitrypsin, α_1 -acid glycoprotein, and transferrin, Ann Clin Lab Sci 11:63-68, 1981.

672 (Ventana-emergente - Popup)

Meites S, editor:

Pediatric clinical chemistry, Washington, D.C., 1977, American Association of Clinical Chemistry, p 20.

673 (Ventana-emergente - Popup)

Zlotkin SH, Casselman CW:

Percentile estimates of reference values for total protein and albumin in sera of premature infants (37 weeks of gestation), Clin Chem 33:411-413, 1987.

674 (Ventana-emergente - Popup)

Jacobs DS, Kasten BL Jr, Demott WR, Wolfson WL: Laboratory test handbook with DRG index, St. Louis, 1984, Mosby Lexi-comp, pp 32-33.

675 (Ventana-emergente - Popup)

Tietz NW, editor:

Clinical guide to laboratory tests, Philadelphia, 1983, Saunders.



676 (Ventana-emergente - Popup)

Schmidt E, Henkel E, Klauke R, et al:

Proposal for standard methods for the determination of enzyme catalytic concentrations in serum and plasma at 37° C, J Clin Chem Clin Biochem 28:805-806, 1990.

677 (Ventana-emergente - Popup)

Bowers GN, McComb RB:

Measurement of total alkaline phosphate activity in human serum, Clin Chem 21:1988-1995, 1975.

678 (Ventana-emergente - Popup)

Reitman S, Frankel S:

A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminase, Am J Clin Pathol 28:56-63, 1975.

679 (Ventana-emergente - Popup)

Karmen S:

A note on the spectrophotometric assay of glutamic oxalacetic transaminase in human blood serum, J Clin Invest 34:131-135, 1955.

680 (Ventana-emergente - Popup)

Bruns D, Savory J, Titheradge A, et al:

Evaluation of the IFCC-recommended procedure for serum aspartate aminotransferase as modified for use with the centrifugal analyzer, Clin Chem 27:156-159, 1981.

681 (Ventana-emergente - Popup)

Tang M, Sullivan M, Gibson D, Truskolawski C:

Kinetic error on Kodak Ektachem: a clue in diagnosis of myeloma, Clin Chem 40:166, 1994.

682 (Ventana-emergente - Popup)

Demetriou JA, Drewes PA, Gin JN:

Enzymes. In Henry RJ, Cannon DC, Winkelman JE, editors: Clinical chemistry: principles and technics, ed 2, Hagerstown, Md., 1974, Harper & Rowe.

683 (Ventana-emergente - Popup)

Meites S, editor:

Pediatric clinical chemistry, Washington, D.C., 1981, American Association for Clinical Chemistry.

684 (Ventana-emergente - Popup)

Mullon CJ, Langer R:

Determination of conjugated and total bilirubin in serum neonates, with use of bilirubin oxidase, Clin Chem 33:1822-1825, 1987.

Doumas BT, Perry B, Jendrzczak B, Davis L: Measurement of direct bilirubin by use of bilirubin oxidase, Clin Chem 33:1349-1353, 1987.

685 (Ventana-emergente - Popup)

Shipman P, Walker A, Bichell D, editors: The human skeleton, Cambridge, Mass., 1985, Harvard University Press.

686 (Ventana-emergente - Popup)

Ham AW, Cormack DH:

Histology, ed 8, Philadelphia, 1979, Lippincott.



687 (Ventana-emergente - Popup)

Shipman P, Walker A, Bichell D, editors: The human skeleton, Cambridge, Mass., 1985, Harvard University Press.

688 (Ventana-emergente - Popup)

Eisman JA, Pounce RL, Ward JD, Moseby JM: Modulation of plasma 1,25-dihydroxyvitamin D in man by stimulation and suppression tests, Lancet 2:931-933, 1979.

689 (Ventana-emergente - Popup)

Gallagher JC, Riggs LB, Eisman J, et al:

Intestinal calcium absorption and serum vitamin D metabolites in normal subjects and osteoporotic patients: effect of age and dietary calcium, J Clin Invest 64:729-736, 1979.

690 (Ventana-emergente - Popup)

Kumar R, Cohen WR, Silva P, Epstein FH: Elevated 1,25-dihydroxyvitamin D levels in normal human pregnancy and lactation, J Clin Invest 63:342-344, 1979.

691 (Ventana-emergente - Popup)

Austin LA, Heath H III:

Calcitonin physiology and pathophysiology, N Engl J Med 304:269-278, 1981.

692 (Ventana-emergente - Popup)

Huwer R, Born W, Ohnhaus EE, Fischer JA: Plasma kinetics and urinary excretion of exogenous human and salmon calcitonin in man, Am J Physiol 236:15-19, 1979.

693 (Ventana-emergente - Popup)

Baylink DJ, Lin CC:

The regulation of endosteal bone volume, J Periodontol 50:43-49, 1979.

694 (Ventana-emergente - Popup)

Avioli LV:

Hormonal aspects of vitamin D metabolism and its clinical implications, Clin Endocrinol Metab 8:547-577, 1979.

695 (Ventana-emergente - Popup)

Brooks MH, Bell NH, Love L, et al:

Vitamin D-dependent rickets type II: resistance of target organs to 1,25-dihydroxyvitamin D, N Engl J Med 298:996-999, 1978.

Scriver C:

Rickets and the pathogenesis of impaired tubular transport of phosphate and other solutes, Am J Med 57:43-49, 1974.

696 (Ventana-emergente - Popup)

Drezner MK, Lyles KW, Haussler MR, Harrelson JM: Evaluation of a role for 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in the pathogenesis and treatment of X-linked hypophosphatemic rickets and osteomalacia, J Clin Invest 66:1020-1032, 1980.

697 (Ventana-emergente - Popup)

Shipman P, Walker A, Bichell D, editors: The human skeleton, Cambridge, Mass., 1985, Harvard University Press.

698 (Ventana-emergente - Popup)

Potts JT, Deftos LJ:

Parathyroid hormone, calcitonin, vitamin D, bone and bone mineral metabolism. In



Bondy PK, Rosenberg LE, editors: Duncan's diseases of metabolism, Philadelphia, 1974, Saunders.

699 (Ventana-emergente - Popup)

Potts JT, Deftos LJ:

Parathyroid hormone, calcitonin, vitamin D, bone and bone mineral metabolism. In Bondy PK, Rosenberg LE, editors: Duncan's diseases of metabolism, Philadelphia, 1974, Saunders.

700 (Ventana-emergente - Popup)

Avioli LV, Haddad JG:

Vitamin D: current concepts, *Metabolism* 22:507-531, 1973.

701 (Ventana-emergente - Popup)

Hollick MF, Frommer JE, McNeill SC, et al:

Photometabolism of 7-dehydrocholesterol to previtamin D3 in skin, *Biochem Biophys Res Commun* 176:107-114, 1977.

702 (Ventana-emergente - Popup)

Avioli LV:

Hormonal aspects of vitamin D metabolism and its clinical implications, *Clin Endocrinol Metab* 8:547-577, 1979.

703 (Ventana-emergente - Popup)

Shipman P, Walker A, Bichell D, editors:

The human skeleton, Cambridge, Mass., 1985, Harvard University Press.

Potts JT, Deftos LJ:

Parathyroid hormone, calcitonin, vitamin D, bone and bone mineral metabolism. In Bondy PK, Rosenberg LE, editors: Duncan's diseases of metabolism, Philadelphia, 1974, Saunders.

Baylink DJ, Lin CC:

The regulation of endosteal bone volume, *J Periodontol* 50:43-49, 1979.

DeLuca HF:

The kidney as an endocrine organ for production of 1,25-dihydroxyvitamin D3, a calcium-mobilizing hormone, *N Engl J Med* 289:359-365, 1973.

Hollick MF, Frommer JE, McNeill SC, et al:

Photometabolism of 7-dehydrocholesterol to previtamin D3 in skin, *Biochem Biophys Res Commun* 176:107-114, 1977.

704 (Ventana-emergente - Popup)

Shipman P, Walker A, Bichell D, editors:

The human skeleton, Cambridge, Mass., 1985, Harvard University Press.

705 (Ventana-emergente - Popup)

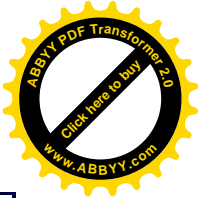
Alkawa JK:

Magnesium: its biologic significance, CRC series on cations of biological significance, Boca Raton, Fla., 1981, CRC Press.

706 (Ventana-emergente - Popup)

Alkawa JK:

Magnesium: its biologic significance, CRC series on cations of biological significance,



Boca Raton, Fla., 1981, CRC Press.

707 (Ventana-emergente - Popup)

Tsang RC:

Neonatal magnesium disturbances, Am J Dis Child 124:282, 1972.

708 (Ventana-emergente - Popup)

DeLuca HF:

The kidney as an endocrine organ for production of 1,25-dihydroxyvitamin D₃, a calcium-mobilizing hormone, N Engl J Med 289:359-365, 1973.

709 (Ventana-emergente - Popup)

Hollick MF, Frommer JE, McNeill SC, et al: Photometabolism of 7-dehydrocholesterol to previtamin D₃ in skin, Biochem Biophys Res Commun 176:107-114, 1977.

710 (Ventana-emergente - Popup)

DeLuca HF:

The kidney as an endocrine organ for production of 1,25-dihydroxyvitamin D₃, a calcium-mobilizing hormone, N Engl J Med 289:359-365, 1973.

Avioli LV:

Hormonal aspects of vitamin D metabolism and its clinical implications, Clin Endocrinol Metab 8:547-577, 1979.

711 (Ventana-emergente - Popup)

Chesney RW, Rosen JF, Hamstra AJ, DeLuca HF: Serum 1,25-dihydroxyvitamin D levels in normal children and in vitamin D disorders, Am J Dis Child 134:135-139, 1980.

712 (Ventana-emergente - Popup)

Chesney RW, Rosen JF, Hamstra AJ, et al:

Absence of seasonal variation in serum concentrations of 1,25-dihydroxyvitamin D despite a rise in 25-hydroxyvitamin D in summer, J Clin Endocrinol Metab 53:139-142, 1981.

713 (Ventana-emergente - Popup)

DeLuca HF:

The vitamin D system in the regulation of calcium and phosphorus metabolism, Nutr Rev 37:161-193, 1979.

714 (Ventana-emergente - Popup)

DeLuca HF:

The kidney as an endocrine organ for production of 1,25-dihydroxyvitamin D₃, a calcium-mobilizing hormone, N Engl J Med 289:359-365, 1973.

Avioli LV:

Hormonal aspects of vitamin D metabolism and its clinical implications, Clin Endocrinol Metab 8:547-577, 1979.

DeLuca HF:

The vitamin D system in the regulation of calcium and phosphorus metabolism, Nutr Rev 37:161-193, 1979.

715 (Ventana-emergente - Popup)

Chesney RW, Rosen JF, Hamstra AJ, DeLuca HF: Serum 1,25-dihydroxyvitamin D levels in normal children and in vitamin D disorders, Am J Dis Child 134:135-139, 1980.

716 (Ventana-emergente - Popup)



Eisman JA, Pounce RL, Ward JD, Moseby JM:

Modulation of plasma 1,25-dihydroxyvitamin D in man by stimulation and suppression tests, *Lancet* 2:931-933, 1979.

717 (Ventana-emergente - Popup)

Gallagher JC, Riggs LB, Eisman J, et al:

Intestinal calcium absorption and serum vitamin D metabolites in normal subjects and osteoporotic patients: effect of age and dietary calcium, *J Clin Invest* 64:729-736, 1979.

718 (Ventana-emergente - Popup)

Kumar R, Cohen WR, Silva P, Epstein FH: Elevated 1,25-dihydroxyvitamin D levels in normal human pregnancy and lactation, *J Clin Invest* 63:342-344, 1979.

719 (Ventana-emergente - Popup)

Massry SG, Ritz E:

The pathogenesis of secondary hyperparathyroidism of renal failure: is there a controversy? *Arch Intern Med* 138:853-856, 1978.

720 (Ventana-emergente - Popup)

Singer FR, Schiller AL, Pyle EB, Krane SM:

Paget's disease of bone. In Avioli LV, Krane SM, editors: *Metabolic bone disease*, vol 2, New York, 1978, Academic Press.

Singer FR:

Huma calcitonin treatment of Paget's disease of bone, *Clin Orthop* 127:86-93, 1977.

Kooh SW, Jones G, Reilly BJ, Fraser D:

Pathogenesis of rickets in chronic hepatobiliary disease in children, *J Pediatr* 94:870-874, 1979.

721 (Ventana-emergente - Popup)

Drezner MK, Neelon FA, Jowsey J:

Hypoparathyroidism: a possible cause of osteomalacia, *J Clin Endocrinol Metab* 45:114, 1977.

Drezner MK, Neelon FA, Haussler, M:

1,25-Dihydroxycholecalciferol deficiency: the probable cause of hypocalcemia and metabolic bone disease in pseudohypoparathyroidism, *J Clin Endocrinol Metab* 42:621, 1976.

Juttmann JR, Buurman CJ, De Kam E, et al:

Serum concentrations of vitamin D in patients with chronic renal failure: consequences for the treatment with 1- α -hydroxy derivatives, *Clin Endocrinol* 14:225-236, 1981.

722 (Ventana-emergente - Popup)

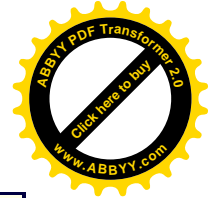
Goldstein DA, Haldimann B, Sherman D, et al: Vitamin D metabolites and calcium metabolism in patients with nephrotic syndrome and normal renal function, *J Clin Endocrinol Metab* 52:116-121, 1981.

723 (Ventana-emergente - Popup)

Juan D:

Hypocalcemia differential diagnosis and mechanisms, *Arch Intern Med* 139:1166-1171, 1979.

724 (Ventana-emergente - Popup)



Broadus AE:

Nephrogenous cyclic AMP, Recent Prog Horm Res 37:665, 1981.

Tsang RC:

Neonatal magnesium disturbances, Am J Dis Child 124:282, 1972.

Aikawa JK:

Magnesium: its biologic significance, CRC series oncations of biological significance, Boca Raton, Fla., 1981, CRC Press.

725 (Ventana-emergente - Popup)

Aikawa JK:

Magnesium: its biologic significance, CRC series oncations of biological significance, Boca Raton, Fla., 1981, CRC Press.

726 (Ventana-emergente - Popup)

Silva OL, Brode LE, Doppman JL:

Calcitonin as a marker for bronchogenic cancer, Cancer 44:680-684, 1979.

McTaggart H, Ivey JL, Sisom K, et al:

Deficient calcitonin response to calcium stimulation in post-menopausal osteoporosis, Lancet 1:475-477, 1982.

727 (Ventana-emergente - Popup)

Austin LA, Heath H III:

Calcitonin physiology and pathophysiology, N Engl J Med 304:269-278, 1981.

728 (Ventana-emergente - Popup)

Austin LA, Heath H III:

Calcitonin physiology and pathophysiology, N Engl J Med 304:269-278, 1981.

729 (Ventana-emergente - Popup)

Austin LA, Heath H III:

Calcitonin physiology and pathophysiology, N Engl J Med 304:269-278, 1981.

730 (Ventana-emergente - Popup)

Huwer R, Born W, Ohnhaus EE, Fischer JA: Plasma kinetics and urinary excretion of exogenous human and salmon calcitonin in man, Am J Physiol 236:15-19, 1979.

731 (Ventana-emergente - Popup)

Ardaillou R:

Kidney and calcitonin, Nephron 15:250-260, 1975.

732 (Ventana-emergente - Popup)

Heersche JNM, Marcus R, Aurbach GD: Calcitonin and the formation of 3',5'-AMP in bone and kidney, Endocrinology 94:241-247, 1974.

733 (Ventana-emergente - Popup)

Heersche JNM, Marcus R, Aurbach GD: Calcitonin and the formation of 3',5'-AMP in bone and kidney, Endocrinology 94:241-247, 1974.

734 (Ventana-emergente - Popup)

Cooper CW:

Recent advances with thyrocalcitonin, Ann Clin Lab Sci 6:119-129, 1976.

735 (Ventana-emergente - Popup)

Cooper CW:

Recent advances with thyrocalcitonin, Ann Clin Lab Sci 6:119-129, 1976.



736 (Ventana-emergente - Popup)

Chase L:

Osteopenia, Am J Med 69:915-922, 1980.

737 (Ventana-emergente - Popup)

Parfitt AM, Oliver I, Villanueva AR:

Bone histology in metabolic bone disease: the diagnostic value of bone biopsy, Orthop Clin North Am 10:329-345, 1979.

738 (Ventana-emergente - Popup)

Eisman JA, Pounce RL, Ward JD, Moseby JM: Modulation of plasma 1,25-dihydroxyvitamin D in man by stimulation and suppression tests, Lancet 2:931-933, 1979.

739 (Ventana-emergente - Popup)

Wallach S:

Management of osteoporosis, Hosp Pract 13:91-98, 1978.

740 (Ventana-emergente - Popup)

Gallagher JC, Rigg BL, Eisman J, et al:

Intestinal calcium absorption and serum vitamin D metabolites in normal subjects and osteoporotic patients: effect of age and dietary calcium, J Clin Invest 64:729-736, 1979.

741 (Ventana-emergente - Popup)

Slovik DM, Adams JS, Neer RM, et al: Deficient production of 1,25-dihydroxyvitamin D in elderly osteoporotic subjects, N Engl J Med 305:372-374, 1981.

742 (Ventana-emergente - Popup)

Gallagher JC, Riggs BL, Jernbak CM, Arnaud CD: Effect of age on serum immunoreactive parathyroid hormone in normal and osteoporotic women, J Lab Clin Med 95:373-385, 1980.

743 (Ventana-emergente - Popup)

Shamonki IM, Fumar AM, Tataryn IV, et al: Age-related changes of calcitonin secretion in females, J Clin Endocrinol Metab 50:437-439, 1980.

744 (Ventana-emergente - Popup)

Gallagher JC, Rigg BL, Eisman J, et al:

Intestinal calcium absorption and serum vitamin D metabolites in normal subjects and osteoporotic patients: effect of age and dietary calcium, J Clin Invest 64:729-736, 1979.

745 (Ventana-emergente - Popup)

Gallagher JC, Riggs BL, Eisman J, et al:

Intestinal calcium absorption and serum vitamin D metabolites in normal subjects and osteoporotic patients: effect of age and dietary calcium, J Clin Invest 64:729-736, 1979.

746 (Ventana-emergente - Popup)

Gallagher JC, Riggs BL, DeLuca HF:

Effect of estrogen on calcium absorption and serum vitamin D metabolites in postmenopausal osteoporosis, J Clin Endocrinol Metab 51:1359-1364, 1980.

747 (Ventana-emergente - Popup)

Avioli LV:

Hormonal aspects of vitamin D metabolism and its clinical implications, Clin Endocrinol Metab 8:547-577, 1979.

748 (Ventana-emergente - Popup)



Winnacker JL, Yeager H, Saunders JA, et al: Rickets in children receiving anticonvulsant drugs, Am J Dis Child 31:286-290, 1977.

749 (Ventana-emergente - Popup)

Scriver CR, Reade TM, DeLuca HF, Hamstra AJ: Serum 1,25-dihydroxyvitamin D levels in normal subjects and in patients with hereditary rickets and bone disease, N Engl J Med 299:976-979, 1978.

750 (Ventana-emergente - Popup)

Chesney RW, Rosen JF, Hamstra AJ, DeLuca HF: Serum 1,25-dihydroxyvitamin D levels in normal children and in vitamin D disorders, Am J Dis Child 134:135-139, 1980.

751 (Ventana-emergente - Popup)

Steichen JJ, Tsang RC, Greer FR, et al: Elevated serum 1,25-dihydroxyvitamin D concentrations in rickets of very low-birth-weight infants, J Pediatr 99:293-298, 1981.

752 (Ventana-emergente - Popup)

Chesney RW, Hamstra AJ, Mazess RB, et al: Circulating vitamin D metabolite concentrations in childhood renal diseases, Kidney Int 21:65-69, 1982.

753 (Ventana-emergente - Popup)

Singer FR:

Huma calcitonin treatment of Paget's disease of bone, Clin Orthop 127:86-93, 1977.

754 (Ventana-emergente - Popup)

Winnacker JL, Yeager H, Saunders JA, et al: Rickets in children receiving anticonvulsant drugs, Am J Dis Child 31:286-290, 1977.

755 (Ventana-emergente - Popup)

Kooh SW, Jones G, Reilly BJ, Fraser D: Pathogenesis of rickets in chronic hepatobiliary disease in children, J Pediatr 94:870-874, 1979.

756 (Ventana-emergente - Popup)

Scriver CR, Reade TM, DeLuca HF, Hamstra AJ:

Serum 1,25-dihydroxyvitamin D levels in normal subjects and in patients with hereditary rickets and bone disease, N Engl J Med 299:976-979, 1978.

757 (Ventana-emergente - Popup)

Wallach S:

Management of osteoporosis, Hosp Pract 13:91-98, 1978.

Gallagher JC, Rigg BL, Eisman J, et al:

Intestinal calcium absorption and serum vitamin D metabolites in normal subjects and osteoporotic patients: effect of age and dietary calcium, J Clin Invest 64:729-736, 1979.

Slovik DM, Adams JS, Neer RM, et al:

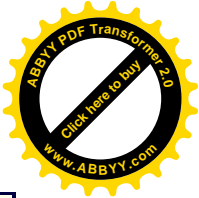
Deficient production of 1,25- dihydroxyvitamin D in elderly osteoporotic subjects, N Engl J Med 305:372-374, 1981.

Gallagher JC, Riggs BL, Jernbak CM, Arnaud CD:

Effect of age on serum immunoreactive parathyroid hormone in normal and osteoporotic women, J Lab Clin Med 95:373-385, 1980.

Shamonki IM, Fumar AM, Tataryn IV, et al:

Age-related changes of calcitonin secretion in females, J Clin Endocrinol Metab



50:437-439, 1980.

Gallaher JC, Riggs BL, DeLuca HF:

Effect of estrogen on calcium absorption and serum vitamin D metabolites in postmenopausal osteoporosis, J Clin Endocrinol Metab 51:1359-1364, 1980.

758 (Ventana-emergente - Popup)

Drezner MK, Neelon FA, Jowsey J: Hypoparathyroidism: a possible cause of osteomalacia, J Clin Endocrinol Metab 45:114, 1977.

759 (Ventana-emergente - Popup)

Drezner MK, Neelon FA, Haussler, M: 1,25-Dihydroxycholecalciferol deficiency: the probable cause of hypocalcemia and metabolic bone disease in pseudohypoparathyroidism, J Clin Endocrinol Metab 42:621, 1976.

760 (Ventana-emergente - Popup)

Scriver CR, Reade TM, DeLuca HF, Hamstra AJ:

Serum 1,25-dihydroxyvitamin D levels in normal subjects and in patients with hereditary rickets and bone disease, N Engl J Med 299:976-979, 1978.

Brooks MH, Bell NH, Love L, et al:

Vitamin D-dependent rickets type II: resistance of target organs to 1,25-dihydroxyvitamin D, N Engl J Med 298:996-999, 1978.

Scriver C:

Rickets and the pathogenesis of impaired tubular transport of phosphate and other solutes, Am J Med 57:43-49, 1974.

Drezner MK, Lyles KW, Haussler MR, Harrelson JM:

Evaluation of a role for 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in the pathogenesis and treatment of X-linked hypophosphatemic rickets and osteomalacia, J Clin Invest 66:1020-1032, 1980.

761 (Ventana-emergente - Popup)

Juttmann JR, Buurman CJ, De Kam E, et al: Serum concentrations of vitamin D in patients with chronic renal failure: consequences for the treatment with 1- α -hydroxy derivatives, Clin Endocrinol 14:225-236, 1981.

762 (Ventana-emergente - Popup)

Goldstein DA, Haldimann B, Sherman D, et al: Vitamin D metabolites and calcium metabolism in patients with nephrotic syndrome and normal renal function, J Clin Endocrinol Metab 52:116-121, 1981.

763 (Ventana-emergente - Popup)

Chesney RW, Rosen JF, Hamstra AJ, DeLuca HF: Serum 1,25-dihydroxyvitamin D levels in normal children and in vitamin D disorders, Am J Dis Child 34:135-139, 1980.

764 (Ventana-emergente - Popup)

Kumar R, Cohen WR, Silva P, Epstein FH: Elevated 1,25-dihydroxyvitamin D levels in normal pregnancy and lactation, J Clin Invest 63:342-344, 1979.

765 (Ventana-emergente - Popup)

Drezner MK, Neelon FA, Haussler, M: 1,25-Dihydroxycholecalciferol deficiency: the probable cause of hypocalcemia and metabolic bone disease in pseudohypoparathyroidism, J Clin Endocrinol Metab 42:621, 1976.

766 (Ventana-emergente - Popup)

Tsang RC, Brown, DR:



The parathyroids. In Kelley V, editor: Practice of pediatrics, vol 1, New York, 1979, Harper & Row.

767 (Ventana-emergente - Popup)

Tsang RC, Venkataraman P:

Pediatric parathyroid and vitamin D-related disorders. In Kaplan LA, editor: *Clinical pediatric and adolescent endocrinology*, Philadelphia, 1982, Saunders.

768 (Ventana-emergente - Popup)

Taylor AB, Stern PH, Bell NH: Abnormal regulation of circulating 25-hydroxyvitamin D in the Williams syndrome, *N Engl J Med* 306:972-975, 1982.

769 (Ventana-emergente - Popup)

Juan D:

Hypocalcemia differential diagnosis and mechanisms, *Arch Intern Med* 139:1166-1171, 1979.

770 (Ventana-emergente - Popup)

Broadus AE:

Nephrogenous cyclic AMP, *Recent Prog Horm Res* 37:665, 1981.

771 (Ventana-emergente - Popup)

Tsang RC:

Neonatal magnesium disturbances, *Am J Dis Child* 124:282, 1972.

772 (Ventana-emergente - Popup)

Aikawa JK:

Magnesium: its biologic significance, CRC series on cations of biological significance, Boca Raton, Fla., 1981, CRC Press.

773 (Ventana-emergente - Popup)

Grace K, Spiler IJ, Tashjian AH Jr:

Natural history of familial medullary thyroid carcinoma: effect of a program for early diagnosis, *N Engl J Med* 229:980-985, 1978.

774 (Ventana-emergente - Popup)

Silva OL, Brode LE, Doppman JL: Calcitonin as a marker for bronchogenic cancer, *Cancer* 44:680-684, 1979.

775 (Ventana-emergente - Popup)

McTaggart H, Ivey JL, Sisom K, et al: Deficient calcitonin response to calcium stimulation in post-menopausal osteoporosis, *Lancet* 1:475-477, 1982.

776 (Ventana-emergente - Popup)

Kaplan M:

Alkaline phosphatase, *N Engl J Med* 286:200-201, 1972.

777 (Ventana-emergente - Popup)

Root AW, Harrison HE:

Recent advances in calcium metabolism, *J Pediatr* 88:1-18, 1976.

778 (Ventana-emergente - Popup)

Shamonki IM, Fumar AM, Tataryn IV, et al: Age-related changes of calcitonin secretion in females, *J Clin Endocrinol Metab* 50:437-439, 1980.

779 (Ventana-emergente - Popup)

Niejadlik DC: Hydroxyproline, *Postgrad Med* 51:214-216, 1972.



780 (Ventana-emergente - Popup)

Avioli LV:

Postmenopausal osteoporosis: prevention versus cure, Fed Proc 40:2418-2422, 1981.

781 (Ventana-emergente - Popup)

Clark EP, Collip JB:

A study of the Tisdall method for the determination of blood serum calcium with a suggested modification, J Biol Chem Balt 63:461-464, 1925.

782 (Ventana-emergente - Popup)

Jackson JE, Breem M, Cheng C:

Fluorometric titration of calcium, J Lab Clin Med 60:700-708, 1962.

783 (Ventana-emergente - Popup)

Walmsley TA, Fowler RT: Optimum use of 8-hydroquinoline in plasma calcium determinations, Clin Chem 27:1782, 1981.

784 (Ventana-emergente - Popup)

Beilby J, Randall A, Davis J:

Variable citrate interference in arsenazo III dye assays of total calcium in serum, Clin Chem 36:824-825, 1990.

785 (Ventana-emergente - Popup)

Kaplan LA, Pesce AJ:

Clinical chemistry: theory, analysis, and correlation, St. Louis, 1984, Mosby, Chapt 3.

Cali JP, Bowers GN, Young DS, et al:

A reference method for the determination of total calcium in serum. In Cooper GR, editor: Selected methods of clinical chemistry, vol 8, Washington, D.C., 1977, American Association for Clinical Chemistry.

786 (Ventana-emergente - Popup)

Cadeau BJ, MacKay JS:

Serum calcium: review of methods, ASCP Check Sample, vol 4, no 8, 1992, PTS 92-1 (PTS-59), American Society of Clinical Pathologists.

787 (Ventana-emergente - Popup)

Lum G, Gambino SR:

A comparison of serum versus heparinized plasma for routine chemistry tests, Am J Clin Pathol 61:108-113, 1974.

788 (Ventana-emergente - Popup)

Winsten S:

Collection and preservation of specimens, Stand Methods Clin Chem 5:1, 1965.

789 (Ventana-emergente - Popup)

Caraway WT:

Chemical and diagnostic specificity of laboratory tests, Am J Clin Pathol 37:445-464, 1962.

790 (Ventana-emergente - Popup)

Elin RJ:

Laboratory tests for the assessment of magnesium status in humans, Magnes Trace Elem 10:172-181, 1992.

791 (Ventana-emergente - Popup)



Denis W:

The determination of magnesium in blood, plasma and serum, J Biol Chem 52:411-415, 1922.

792 (Ventana-emergente - Popup)

Schwartzbach G, Bidermann W, Banserter F.: Komplex-one VI: neue einfache Titrimethoden zur Bestimmung der Wasserharte, Helv Chim Acta 29:811-818, 1946.

793 (Ventana-emergente - Popup)

Brien M, Marshall RT:

An automated fluorometric method for the determination of magnesium in serum and urine using *o-o*-dihydroxyazobenzene: studies on normal and uremic subjects, J Lab Clin Med 68:701-712, 1966.

794 (Ventana-emergente - Popup)

Elin RJ:

Laboratory tests for the assessment of magnesium status in humans, Magnes Trace Elem 10:172-181, 1992.

795 (Ventana-emergente - Popup)

Elin RJ:

Laboratory tests for the assessment of magnesium status in humans, Magnes Trace Elem 10:172-181, 1992.

796 (Ventana-emergente - Popup)

Gindler EM, Heth DA:

Colorimetric determination with bound "calmagite" of magnesium in human blood serum, Clin Chem 17:663, 1971 (abstract).

797 (Ventana-emergente - Popup)

Elin RJ:

Laboratory tests for the assessment of magnesium status in humans, Magnes Trace Elem 10:172-181, 1992.

Baginski ES, Marie SS:

Magnesium in biological fluids, Selected Methods Clin Chem 9:277-281, 1982.

798 (Ventana-emergente - Popup)

Dixon DJ, Denton J, Kaufman RA: New magnesium method for the Cobas™ Chemistry Systems using chlorophosphonazo III, Clin Chem 36:1068, 1990.

799 (Ventana-emergente - Popup)

Dixon DJ, Denton J, Kaufman RA: New magnesium method for the Cobas™ Chemistry Systems using chlorophosphonazo III, Clin Chem 36:1068, 1990.

800 (Ventana-emergente - Popup)

Elin RJ:

Laboratory tests for the assessment of magnesium status in humans, Magnes Trace Elem 10:172-181, 1992.

801 (Ventana-emergente - Popup)

Martin BJ, McGregor CW: Measurement of serum magnesium: effect of delay in separation from erythrocytes, Clin Chem 32:564, 1986.

802 (Ventana-emergente - Popup)

Lowenstein FW, Stanton MF:



Serum magnesium levels in the United States, 1971-1974, J Am Coll Nutr 5:399-414, 1987.

803 (Ventana-emergente - Popup)

Bell RD, Doisey EA:

Rapid colorimetric methods for the determination of phosphorus in urine and blood, J Biol Chem 44:55-67, 1920.

Fiske CH, Subbarow Y:

The colorimetric determination of phosphorus, J Biol Chem 66:375-400, 1925.

Bartlett GR:

Phosphorus assay in column chromatography, J Biol Chem 234:466-468, 1959.

804 (Ventana-emergente - Popup)

Scott MG:

Inorganic phosphorus: review of methods, ASCP Check Sample vol 8, no 5, 1992, PTS 92-5 (PTS-63), American Society of Clinical Pathologists.

805 (Ventana-emergente - Popup)

Simonsen DG, Wertman M, Westover LM, Mehl JW: The determination of serum phosphate by the molybdivanadate method, J Biol Chem 166:747-755, 1946.

806 (Ventana-emergente - Popup)

Adam A, Boulanger J, Azzouzi M, Ers P: Colorimetric versus enzymatic determination of serum phosphorus, Clin Chem 30:1724-1725, 1984 (letter).

807 (Ventana-emergente - Popup)

Baginski ES, Epstein E, Zak B: Review of phosphate methodologies, Ann Clin Lab Sci 5:399-416, 1975.

808 (Ventana-emergente - Popup)

Schultz DW, Passanneau JV, Lowry OH:

An enzymatic method for the measurement of inorganic phosphate, Anal Biochem 19:300-314, 1967.

809 (Ventana-emergente - Popup)

Ganong WF:

Endocrine functions of the pancreas and the regulation of carbohydrate metabolism. In Review of medical physiology, ed 15, Norwalk, Conn., 1991, Appleton & Lange.

810 (Ventana-emergente - Popup)

Cotran RS, Kumar V, Robbins SL:

The endocrine pancreas. In Robbins pathologic basis of disease, Philadelphia, 1989, Saunders.

811 (Ventana-emergente - Popup)

Go VLW:

Pancreatic secretion. In Stein JH, editor: Internal medicine, Boston, 1990, Little, Brown & Co, pp 434-438 and 446-450.

812 (Ventana-emergente - Popup)

Ackermann U:

Essentials of human physiology, St. Louis, 1992, Mosby, pp 121-123.

813 (Ventana-emergente - Popup)

Scarpelli DG:



The pancreas. In Rubin E, Farber JL, editors: Essential pathology, Philadelphia, 1990, Lippincott, pp 445-455.

814 (Ventana-emergente - Popup)

Cotran RS, Kumar V, Robbins SL:

The endocrine pancreas. In Robbins pathologic basis of disease, Philadelphia, 1989, Saunders.

815 (Ventana-emergente - Popup)

Steinberg W:

Pancreatitis. In Wyngaarden JB, Smith LH Jr, Bennett JC, editors: Cecil textbook of medicine, ed 19, Philadelphia, 1992, Saunders, vol 1.

816 (Ventana-emergente - Popup)

Greenberger NS, Toskes PP, Isselbacher KJ:

Acute and chronic pancreatitis. In Wilson JD, Braunwald E, Isselbacher KJ, et al, editors: Harrison's principles of internal medicine, ed 12, New York, 1991, McGraw-Hill.

817 (Ventana-emergente - Popup)

Cotran RS, Kumar V, Robbins SL:

The exocrine pancreas. In Robbins pathologic basis of disease, Philadelphia, 1989, Saunders.

Lott JA, Patel ST, Sawhney K, et al:

Assays of serum lipase: analytical and clinical considerations, Clin Chem 32:1290-1302, 1986.

818 (Ventana-emergente - Popup)

Ganong WF:

Regulation of gastrointestinal function. In Review of medical physiology, ed 15, Norwalk, Conn., 1991, Appleton & Lange.

Gullo L, Pezzilli R, Bellanova B, et al:

Influence of the thyroid on exocrine pancreatic function, Gastroenterology 100:1392-1396, 1991.

Lembcke B, Creutzfeldt W, Schleser S, et al:

Effect of the somatostatin analogue Sandostatin (SMS 201-995) on gastrointestinal, pancreatic and biliary function and hormone release in normal men, Digestion 36:108-124, 1987.

Sarles J:

Current techniques for investigating exocrine pan-creatic function in children, Ann Pediatr Paris 39:221-225, 1992.

819 (Ventana-emergente - Popup)

Lu L, Louie D, Owyang C:

A cholecystokinin releasing peptide mediates feedback regulation of pancreatic secretion, Am J Physiol 256:G430-G435, 1989.

Schmidt WE, Creutzfeldt W, Hocker M, et al: Cholecystokinin receptor antagonist loxiglumide: influence on bilio-pancreatic secretion and gastrointestinal hormones in man, Digestion 46(suppl 2):232-239, 1990.

820 (Ventana-emergente - Popup)

Cotran RS, Kumar V, Robbins SL:



The exocrine pancreas. In Robbins pathologic basis of disease, Philadelphia, 1989, Saunders.

821 (Ventana-emergente - Popup)

Owyang C, Louie DS, Tatum D:

Feedback regulation of pancreatic enzyme secretion: suppression of cholecystokinin release by trypsin, J Clin Invest 77:2042-2047, 1986.

822 (Ventana-emergente - Popup)

Lott JA, Ellison EC, Applegate D: The importance of objective data in the diagnosis of pancreatitis, Clin Chim Acta 183:33-40, 1989.

823 (Ventana-emergente - Popup)

Go VLW:

Pancreatic secretion. In Stein JH, editor: Internal medicine, Boston, 1990, Little, Brown & Co, pp 434-438 and 446-450.

824 (Ventana-emergente - Popup)

Bolinder J, Wahrenberg H, Persson A, et al:

Effect of pancreas transplantation on glucose counterregulation in insulin-dependent diabetic patients prone to severe hypoglycaemia, J Intern Med 230:527-533, 1991.

Landgraf R, Nusser J, Riepl RL, et al:

Metabolic and hormonal studies of type 1 (insulin- dependent) diabetic patients after successful pancreas and kidney transplantation, Diabetologia 34(suppl 1):S61-S67, 1991.

825 (Ventana-emergente - Popup)

Speicher CE:

The right test, a physician's guide to laboratory medicine, ed 2, Philadelphia, 1993, Saunders, pp 122-126.

826 (Ventana-emergente - Popup)

Lott JA:

Enzyme tests in gastroenterology. In Moss DW, Rosalki SB, editors: Principles and practice of diagnostic enzymology, ed 2, London, 1995, Edward Arnold Publishers.

827 (Ventana-emergente - Popup)

Lott JA:

Pancreatic disorders, Anal Chem 63:176R-180R, 1991.

Waters DL, Dorney SFA, Gaskin KJ, et al: Pancreatic function in infants identified as having cystic fibrosis in a neonatal screening program, N Engl J Med 322:303-308, 1990.

828 (Ventana-emergente - Popup)

Lott JA:

Pancreatic disorders, Anal Chem 63:176R-180R, 1991.

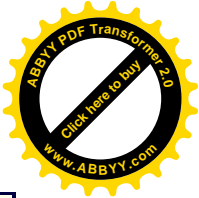
829 (Ventana-emergente - Popup)

Greenberger NS, Toskes PP, Isselbacher KJ:

Acute and chronic pancreatitis. In Wilson JD, Braunwald E, Isselbacher KJ, et al, editors: Harrison's principles of internal medicine, ed 12, New York, 1991, McGraw-Hill.

Lott JA, Patel ST, Sawhney K, et al:

Assays of serum lipase: analytical and clinical considerations, Clin Chem



32:1290-1302, 1986.

830 (Ventana-emergente - Popup)

Steinberg W:

Pancreatitis. In Wyngaarden JB, Smith LH Jr, Bennett JC, editors: Cecil textbook of medicine, ed 19, Philadelphia, 1992, Saunders, vol 1.

Greenberger NS, Toskes PP, Isselbacher KJ:

Acute and chronic pancreatitis. In Wilson JD, Braunwald E, Isselbacher KJ, et al, editors: Harrison's principles of internal medicine, ed 12, New York, 1991, McGraw-Hill.

Lott JA, Bond LW, Bobo RC, et al:

Valproic acid-associated pancreatitis: report of three cases and a brief review, Clin Chem 36:395-397, 1990.

831 (Ventana-emergente - Popup)

Lott JA, Bond LW, Bobo RC, et al:

Valproic acid-associated pancreatitis: report of three cases and a brief review, Clin Chem 36:395-397, 1990.

832 (Ventana-emergente - Popup)

Young DS:

Effects of drugs on clinical laboratory tests, ed 4, Washington, D.C., 1995, American Association for Clinical Chemistry Press, pp 3.34-3.36.

833 (Ventana-emergente - Popup)

Cotran RS, Kumar V, Robbins SL: The exocrine pancreas. In Robbins pathologic basis of disease, Philadelphia, 1989, Saunders.

834 (Ventana-emergente - Popup)

Steinberg W:

Pancreatitis. In Wyngaarden JB, Smith LH Jr, Bennett JC, editors: Cecil textbook of medicine, ed 19, Philadelphia, 1992, Saunders, vol 1.

Greenberger NS, Toskes PP, Isselbacher KJ:

Acute and chronic pancreatitis. In Wilson JD, Braunwald E, Isselbacher KJ, et al, editors: Harrison's principles of internal medicine, ed 12, New York, 1991, McGraw-Hill.

835 (Ventana-emergente - Popup)

Lott JA, Patel ST, Sawhney K, et al: Assays of serum lipase: analytical and clinical considerations, Clin Chem 32:1290-1302, 1986.

836 (Ventana-emergente - Popup)

Lott JA:

Pancreatic disorders, Anal Chem 63:176R-180R, 1991.

Lott JA, Lu CJ:

Lipase isoforms and amylase isoenzymes: assays and application in the diagnosis of acute pancreatitis, Clin Chem 37:361-368, 1991.

837 (Ventana-emergente - Popup)

Lott JA, Ellison EC, Applegate D:

The importance of objective data in the diagnosis of pancreatitis, Clin Chim Acta 183:33-40, 1989.

838 (Ventana-emergente - Popup)



Lott JA, Patel ST, Sawhney K, et al:

Assays of serum lipase: analytical and clinical considerations, Clin Chem 32:1290-1302, 1986.

Lott JA, Lu CJ:

Lipase isoforms and amylase isoenzymes: assays and application in the diagnosis of acute pancreatitis, Clin Chem 37:361-368, 1991.

839 (Ventana-emergente - Popup)

Wong ECC, Butch AW, Rosenblum JL, et al.:

The clinical chemistry laboratory and acute pancreatitis, Clin Chem 39:234-243, 1993.

840 (Ventana-emergente - Popup)

Lott JA, Lu CJ:

Lipase isoforms and amylase isoenzymes: assays and application in the diagnosis of acute pancreatitis, Clin Chem 37:361-368, 1991.

Zweig MH, Campbell G:

Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine, Clin Chem 39:561-577, 1993.

841 (Ventana-emergente - Popup)

Wong ECC, Butch AW, Rosenblum JL, et al.:

The clinical chemistry laboratory and acute pancreatitis, Clin Chem 39:234-243, 1993.

842 (Ventana-emergente - Popup)

Lott JA:

Amylase. In Lott JA, Wolf PL, editors: Clinical enzymology: a case-oriented approach, St. Louis, 1986, Mosby.

843 (Ventana-emergente - Popup)

Bruns DC, Mills SE, Savory J:

Amylase in fallopian tube and serous ovarian neoplasms: immunohistochemical localization, Arch Pathol Lab Med 106:17-20, 1982.

844 (Ventana-emergente - Popup)

Lott JA:

Amylase. In Lott JA, Wolf PL, editors: Clinical enzymology: a case-oriented approach, St. Louis, 1986, Mosby.

845 (Ventana-emergente - Popup)

Mifflin TE, Forsman RW, Bruns DE:

Interaction of immobilized anti-salivary amylase antibody with human macroamylases: implications for use in a pancreatic amylase assay to distinguish macroamylasemia from acute pancreatitis, Clin Chem 35:1651-1654, 1989.

846 (Ventana-emergente - Popup)

Steinberg W:

Pancreatitis. In Wyngaarden JB, Smith LH Jr, Bennett JC, editors: Cecil textbook of medicine, ed 19, Philadelphia, 1992, Saunders, vol 1.

847 (Ventana-emergente - Popup)

Beaudet A, Bowcock A, Buchwald M, et al:

Linkage of cystic fibrosis to two tightly linked DNA markers: joint report from a collaborative study, Am J Hum Genet 39:681-693, 1986.



848 (Ventana-emergente - Popup)

Miller TL, Winter HS, Luginbuhl LM, et al: Pancreatitis in pediatric human immunodeficiency virus infection, *J Pediatr* 120:223-227, 1992.

849 (Ventana-emergente - Popup)

Shelton MJ, O'Donnell AM, Morse GD: Didanosine, *Ann Pharmacother* 26:660-670, 1992.
Bonacini M:

Pancreatic involvement in human immunodeficiency virus infection, *J Clin Gastroenterol* 13:58-64, 1991.

850 (Ventana-emergente - Popup)

DiMagno EP:

Carcinoma of the pancreas. In Wyngaarden JB, Smith LH Jr, Bennett JC, editors: *Cecil textbook of medicine*, ed 19, Philadelphia, 1992, Saunders.

851 (Ventana-emergente - Popup)

Lott JA:

Enzyme tests in gastroenterology. In Moss DW, Rosalki SB, editors: *Principles and practice of diagnostic enzymology*, ed 2, London, 1995, Edward Arnold Publishers.

852 (Ventana-emergente - Popup)

Scarpelli DG:

The pancreas. In Rubin E, Farber JL, editors: *Essential pathology*, Philadelphia, 1990, Lippincott, pp 445-455.

Greenberger NS, Toskes PP, Isselbacher KJ:

Acute and chronic pancreatitis. In Wilson JD, Braunwald E, Isselbacher KJ, et al, editors: *Harrison's principles of internal medicine*, ed 12, New York, 1991, McGraw-Hill.

Grunfeld C:

Pancreatic islet cell tumors. In Wyngaarden JB, Smith LH Jr, Bennett JC, editors: *Cecil textbook of medicine*, ed 19, Philadelphia, 1992, Saunders.

853 (Ventana-emergente - Popup)

Scarpelli DG:

The pancreas. In Rubin E, Farber JL, editors: *Essential pathology*, Philadelphia, 1990, Lippincott, pp 445-455.

Greenberger NS, Toskes PP, Isselbacher KJ:

Acute and chronic pancreatitis. In Wilson JD, Braunwald E, Isselbacher KJ, et al, editors: *Harrison's principles of internal medicine*, ed 12, New York, 1991, McGraw-Hill.

854 (Ventana-emergente - Popup)

Cotran RS, Kumar V, Robbins SL:

The endocrine pancreas. In Robbins pathologic basis of disease, Philadelphia, 1989, Saunders.

855 (Ventana-emergente - Popup)

Cotran RS, Kumar V, Robbins SL:

The endocrine pancreas. In Robbins pathologic basis of disease, Philadelphia, 1989, Saunders.



856 (Ventana-emergente - Popup)

Skogseid B, Oberg K, Benson L, et al:

A standardized meal stimulation test of the endocrine pancreas for early detection of pancreatic endocrine tumors in multiple endocrine neoplasia type 1 syndrome: five years' experience, J Clin Endocrinol Metab 64:1233-1240, 1987.

857 (Ventana-emergente - Popup)

Skogseid B, Oberg K, Benson L, et al:

A standardized meal stimulation test of the endocrine pancreas for early detection of pancreatic endocrine tumors in multiple endocrine neoplasia type 1 syndrome: five years' experience, J Clin Endocrinol Metab 64:1233-1240, 1987.

858 (Ventana-emergente - Popup)

Okabe H, Uji T, Netsu K, Noma A:

Automated measurement of amylase with 4-nitrophenylmaltoheptaoside as a substrate and use of a selective amylase inhibitor, Clin Chem 30:1219-1222, 1984.

859 (Ventana-emergente - Popup)

Hofman M, Shaffer M:

Fluorescence depolarization assay for quantitative α -amylase in serum and urine, Clin Chem 31:1478 -1480, 1985.

860 (Ventana-emergente - Popup)

Gillard BK, Simbala JA, Goodglick L:

Reference intervals for amylase isoenzymes in serum and plasma of infants and children, Clin Chem 29:1119-1123, 1983.

861 (Ventana-emergente - Popup)

Doumas BT, Hause LL, Simuncak DM:

Differences between values for plasma and serum in tests performed in the Ektachem 700 XR analyzer, and evaluation of "plasma separator tubes (PST)," Clin Chem 35:151-153, 1989.

862 (Ventana-emergente - Popup)

Henry RJ:

Clinical chemistry: principles and techniques, ed 4, New York, 1964, Harper & Row.

863 (Ventana-emergente - Popup)

Chen CT, Dineen H, Newton JD: Specificity of different substrates used in three amylase assays, Clin Chem 34:1363-1364, 1988.

864 (Ventana-emergente - Popup)

Gillard BK, Simbala JA, Goodglick L:

Reference intervals for amylase isoenzymes in serum and plasma of infants and children, Clin Chem 29:1119-1123, 1983.

865 (Ventana-emergente - Popup)

Gillard BK, Simbala JA, Goodglick L:

Reference intervals for amylase isoenzymes in serum and plasma of infants and children, Clin Chem 29:1119-1123, 1983.

866 (Ventana-emergente - Popup)

Cherry IS, Crandall IA Jr:

The specificity of pancreatic lipase: its appearance in the blood after pancreatic injury,



Am J Physiol 100:266-273, 1932.

867 (Ventana-emergente - Popup)

Tietz NW, Fiereck EA:

Measurement of lipase in serum. In Cooper GR, editor: Standard methods of clinical chemistry, vol 7, New York, 1972, Academic Press.

868 (Ventana-emergente - Popup)

Cerolotti F, Bonini PA, Murone M, et al.: Measurement of lipase activity by differential technique, Clin Chem 31:257-260, 1985.

869 (Ventana-emergente - Popup)

Zinterhofer L, Wardlaw S, Jatlow P, Seligson D: Nephelometric determination of pancreatic enzymes. II. Lipase, Clin Chim Acta 44:173-178, 1973.

870 (Ventana-emergente - Popup)

Kannisto J, Lalla M, Lukkari E:

Characterization and elimination of a factor in serum that interferes with turbidimetry and nephelometry of lipase, Clin Chem 29:96-99, 1983.

871 (Ventana-emergente - Popup)

Fassati P, Ponti M, Paris P, et al:

Kinetic colorimetric assay of lipase in serum, Clin Chem 38:211-215, 1992.

872 (Ventana-emergente - Popup)

Robbrecht JH, DeBuyzere ML, Delanghe JR:

Wake UV colorimetric pancreatic lipase assay with 1,2-dilinoleoylglycerol as substrate evaluated, Clin Chem 35:1540-1541, 1989.

873 (Ventana-emergente - Popup)

Fassati P, Ponti M, Paris P, et al:

Kinetic colorimetric assay of lipase in serum, Clin Chem 38:211-215, 1992.

874 (Ventana-emergente - Popup)

Moller-Peterson J, Klaerke M, Dati F, et al. Immunochemical qualitative latex agglutination test for pancreatic lipase in serum evaluated for use in diagnosis of acute pancreatitis, Clin Chem 31:1207-1210, 1986.

875 (Ventana-emergente - Popup)

van Ingen HE, Sanders GTB:

Clinical evaluation of pancreatic lipase mass concentration assay, Clin Chem 38:211-215, 1992.

876 (Ventana-emergente - Popup)

Tietz NW, Astles JR, Shuey DF:

Lipase activity measured in serum by a continuous-monitoring pH-stat technique/Man update, Clin Chem 35:1688-1693, 1989.

877 (Ventana-emergente - Popup)

Doumas BT, Hause LL, Simuncak DM, et al:

Differences between values for plasma and serum in tests performed in the Ektachem 700 XR analyzer, and evaluation of "plasma separator tubes (PST)," Clin Chem 35:151-153, 1989.

878 (Ventana-emergente - Popup)

Ackermann U:



Essentials of human physiology, St. Louis, 1992, Mosby, pp 121-123.

Ganong WF:

Regulation of gastrointestinal function. In Review of medical physiology, ed 15, Norwalk, Conn., 1991, Appleton & Lange.

Lembcke B, Creutzfeldt W, Schleser S, et al:

Effect of the somatostatin analogue Sandostatin (SMS 201-995) on gastrointestinal, pancreatic and biliary function and hormone release in normal men, Digestion 36:108-124, 1987.

Schmidt WE, Creutzfeldt W, Hocker M, et al:

Cholecystokinin receptor antagonist loxiglumide: influence on bilio-pancreatic secretion and gastrointestinal hormones in man, Digestion 46(suppl 2):232-239, 1990.

879 (Ventana-emergente - Popup)

Moog F:

The lining of the small intestine, Sci Am 245: 154-176, 1981.

880 (Ventana-emergente - Popup)

Track NS:

The gastrointestinal endocrine system, Can Med Assoc J 122: 287-291, 1980.

881 (Ventana-emergente - Popup)

Track NS:

The gastrointestinal endocrine system, Can Med Assoc J 122: 287-291, 1980.

882 (Ventana-emergente - Popup)

Rayford PL, Miller TA, Thompson JC: Secretin, cholecystokinin and newer gastrointestinal hormones, N Engl J Med 294:1093-1101, 1157-1164, 1976.

883 (Ventana-emergente - Popup)

Ingelfinger FJ:

Gastrointestinal absorption, Nutrition Today, pp 2-10, March 1967.

884 (Ventana-emergente - Popup)

Rayford PL, Miller TA, Thompson JC: Secretin, cholecystokinin and newer gastrointestinal hormones, N Engl J Med 294:1093-1101, 1157-1164, 1976.

885 (Ventana-emergente - Popup)

Dawson AM:

The absorption of disaccharides. In Card WI, Creamer B, editors: Modern trends in gastroenterology, vol 4, London, 1970, Butterworth.

886 (Ventana-emergente - Popup)

McColl I, Sladen GEC, editors: Intestinal absorption in man, New York, 1975, Academic Press.

887 (Ventana-emergente - Popup)

Wilson FA, Dietschy JM:

Differential diagnostic approach to clinical problems of malabsorption, Gastroenterology 61:911-921, 1971.

888 (Ventana-emergente - Popup)

Ingelfinger FJ:

Gastrointestinal absorption, Nutrition Today, pp 2-10, March 1967.

889 (Ventana-emergente - Popup)



Wiss O, Gloor U:

Absorption, distribution, storage and metabolites of vitamin K and related quinones, Vitam Horm 24:576-586, 1966.

DeLuca HF, Suttie JW, editors:

The fat soluble vitamins, Madison, Wisc., 1970, University of Wisconsin Press.

890 (Ventana-emergente - Popup)

Holdsworth CD:

Calcium absorption in man. In McColl I, Sladen GEG, editors: New York, 1975, Academic Press.

891 (Ventana-emergente - Popup)

Martiner-Torres C, Layrisse M: Nutritional factors in iron-deficiency: food iron absorption, Clin Hematol 2:339-352, 1973.

892 (Ventana-emergente - Popup)

Bloom SR, Polak JM:

In Glass B, editor: Progress in gastroenterology, New York, 1977, Grune & Stratton.

893 (Ventana-emergente - Popup)

McGuigan JE:

Gastrointestinal hormones, Annu Rev Med 29:307, 1978.

Rehfeld JF:

Gastrointestinal hormones. In Crane RK, editor: International review of physiology: gastrointestinal physiology III, vol 19, Baltimore, 1979, University Park Press.

894 (Ventana-emergente - Popup)

Dockray GJ:

Gastrin overview. In Bloom SR, editor: Gut hormones, Edinburgh, 1978, Churchill Livingstone.

895 (Ventana-emergente - Popup)

Strunz UT, Walsh JH, Grossman MI: Stimulation of gastrin release in dogs by individual amino acids, Proc Soc Exp Biol Med 157:440-441, 1978.

896 (Ventana-emergente - Popup)

Polak JM, Pearse AGE, Joffe SN, et al: Quantification of secretin release by acid using immunocytochemistry and radioimmunoassay, Experientia 31:462-464, 1975.

897 (Ventana-emergente - Popup)

Rayford PL, Miller TA, Thompson JC: Secretin cholecystokinin, and newer gastrointestinal hormones, N Engl J Med 294:1093-1101, 1976.

898 (Ventana-emergente - Popup)

Schaffalitzky de Muckadell OB, Fahrenkrug J, Watt-Boolsen S, et al: Pancreatic response and plasma secretin concentration during infusion of low dose secretin in man, Scand J Gastroenterol 13:305-311, 1978.

899 (Ventana-emergente - Popup)

Bryant MG, Bloom SR, Polak JM, et al: Possible dual role for vasoactive intestinal peptide as gastrointestinal hormone and neurotransmitter substance, Lancet 1:991-993, 1976.

900 (Ventana-emergente - Popup)

Lin TM, Evans DC, Chance RE, et al:

Bovine pancreatic polypeptide: action on gastric and pancreatic secretion in dogs, Am



J Physiol 232:E311-E315, 1977.

901 (Ventana-emergente - Popup)

Anderson D, Elahi D, Brown JC, et al: Oral glucose augmentation of insulin secretin, J Clin Invest 62:152-161, 1978.

902 (Ventana-emergente - Popup)

Grimelius L, Polar JM, Solcia E, et al: Gut hormones, Edinburgh, 1978, Churchill Livingstone.

903 (Ventana-emergente - Popup)

Polak JM, Pearse AGE, Grimelius L, et al: Growth hormone release\Ninhibiting hormone in gastrointestinal and pancreatic D cells, Lancet 1:1220-1222, 1975.

904 (Ventana-emergente - Popup)

Creutzfeldt W, Arnold R:

Somatostatin and the stomach: exocrine and endocrine aspects, First International Somatostatin Symposium, Freiburg, Germany, 1977, Metabolism 27:1309-1315, 1978.

905 (Ventana-emergente - Popup)

Raptis S, Gerich JE:

Foreword, First International Somatostatin Symposium, Freiburg, Germany, 1977, Metabolism 27:1129-1130, 1978.

906 (Ventana-emergente - Popup)

Vale W, Rivier C, Brown M: Regulatory peptides of the hypothalamus, Annu Rev Physiol 39:473-527, 1977.

907 (Ventana-emergente - Popup)

Creutzfeldt W, Arnold R:

Somatostatin and the stomach: exocrine and endocrine aspects, First International Somatostatin Symposium, Freiburg, Germany, 1977, Metabolism 27:1309-1315, 1978.

908 (Ventana-emergente - Popup)

Pearson WN:

Assessment of nutritional status: biochemical methods. In Beaton GH, McHenry EW, editors: Nutrition: a comprehensive treatise, New York, 1966, Academic Press.

909 (Ventana-emergente - Popup)

Mirsky IA:

Physiologic, psychologic, and social determinants in the etiology of duodenal ulcer, Am J Dig Dis 3:285-314, 1958.

910 (Ventana-emergente - Popup)

Grossman MI:

Elevated serum pepsinogen I: a genetic marker for duodenal ulcer disease, N Engl J Med 300:89, 1979.

911 (Ventana-emergente - Popup)

Grossman MI, Guth PH, Isenberg JI, et al:

A new look at peptic ulcer, Ann Intern Med 84:57-67, 1976.

912 (Ventana-emergente - Popup)

Genta RM:

Counting angels and bacteria: the quest for a unifying theory of ulcerogenesis: an editorial, Am J Clin Pathol 98:549-551, 1992.



913 (Ventana-emergente - Popup)

Forbes GM, Glaser ME, Cullen DJE, et al:

Duodenal ulcer treated with Helicobacter pylori eradication: seven year follow-up, Lancet 343:258-260, 1994.

914 (Ventana-emergente - Popup)

Shahon BB, Horowitz S:

Cancer of the stomach: analysis of 1152 cases, Surgery 39:204-221, 1956.

915 (Ventana-emergente - Popup)

The Eurogastric Study Group:

An international association between Helicobacter pylori infection and gastric cancer, Lancet 341:1359-1362, 1993.

916 (Ventana-emergente - Popup)

Deveney CW, Deveney KS, Way LW:

The Zollinger-Ellison syndrome\23 years later, Ann Surg 188:384-393, 1978.

917 (Ventana-emergente - Popup)

Walsh JH, Grossman MT:

Gastrin, N Engl J Med 292:1324-1334, 1377-1384, 1975.

918 (Ventana-emergente - Popup)

Johnson GJ, Somerskill WHK, Anderson VE:

Clinical and genetic investigation of a large kindred with multiple endocrine adenomatosis, N Engl J Med 277:1379-1386, 1967.

919 (Ventana-emergente - Popup)

Ippoliti AF:

Zollinger-Ellison syndrome: provocative diagnostic tests, Ann Intern Med 87:787-788, 1977.

Deveney CW, Deveney KS, Jaffe BM, et al:

Use of calcium and secretin in the diagnosis of gastrinoma, Ann Intern Med 87:680-686, 1979.

920 (Ventana-emergente - Popup)

Trier JS:

Celiac sprue (review article), N Engl J Med 325:1709-1719, 1992.

921 (Ventana-emergente - Popup)

Gray GM:

Congenital and adult intestinal lactose deficiency, N Engl J Med 294:1057-1058, 1976.

922 (Ventana-emergente - Popup)

Kuehn PG, Coley GM, Christine B: Carcinoid syndrome: a study of 16 cases, Hartford Hosp Bull 28:305-307, 1973.

923 (Ventana-emergente - Popup)

Trier JS:

Celiac sprue (review article), N Engl J Med 325:1709-1719, 1992.

924 (Ventana-emergente - Popup)

Jeejeebhoy KN:

Symposium on diarrhea. I. Definition and mechanisms of diarrhea, Can Med Assoc J 116:737-738, 1977.



925 (Ventana-emergente - Popup)

Gilbertson VA:

The earlier diagnosis of adenocarcinoma of the large intestine, Cancer 27:143-149, 1971.

926 (Ventana-emergente - Popup)

Kelly CP, Pothoulakis C, LaMont JT: Clostridium difficile colitis (review article), N Engl J Med 330:257-262, 1994.

927 (Ventana-emergente - Popup)

Middleton SJ, Shorthouse M, Hunter JO: Increased nitric oxide synthesis in ulcerative colitis, Lancet 341:465-466, 1993.

928 (Ventana-emergente - Popup)

Ward S, Gillespie IE, Passaro ER, et al:

Comparison of Histalog and histamine as stimulants for maximal gastric secretions in human subjects and in dogs, Gastroenterology 44:620-626, 1963.

Abernethy RJ, Gillespie IE, Lowrie JH, et al:

Pentagastrin as a stimulant of maximal gastric acid response in man: a multicentre pilot study, Lancet 1:291-295, 1967.

Kirsner JB, Ford H:

The gastric secretory response to Histalog: one-hour basal and Histalog secretion in normal persons and in patients with duodenal ulcer and gastric ulcer, J Lab Clin Med 46:307-311, 1955.

929 (Ventana-emergente - Popup)

Blackman AH, Lambert DL, Thayer WR, et al: Computed normal values for peak acid output based on age, sex and body weight, Am J Dig Dis 15:783-789, 1970.

930 (Ventana-emergente - Popup)

Blackman AH, Lambert DL, Thayer WR, et al: Computed normal values for peak acid output based on age, sex and body weight, Am J Dig Dis 15:783-789, 1970.

931 (Ventana-emergente - Popup)

McNeely MDD:

Gastrointestinal function. In Sonnenwirth AC, Jarett L, editors: Gradwohl's clinical laboratory methods and diagnosis, ed 8, St. Louis, 1980, Mosby.

932 (Ventana-emergente - Popup)

Ippoliti AF:

Zollinger-Ellison syndrome: provocative diagnostic tests, Ann Intern Med 87:787-788, 1977.

Deveney CW, Deveney KS, Jaffe BM, et al:

Use of calcium and secretin in the diagnosis of gastrinoma, Ann Intern Med 87:680-686, 1979.

933 (Ventana-emergente - Popup)

Herbert V:

Detection of malabsorption of vitamin B12 to gastric or intestinal dysfunction, Semin Nucl Med 2:220-234, 1972.

934 (Ventana-emergente - Popup)

Drumme GD, Benson JA, Jones CM: Microscopical examination of the stool for



steatorrhea, N Engl J Med 264:85-87, 1961.

935 (Ventana-emergente - Popup)

Massion CG, McNeely MD:

Accurate micromethod for estimation of both medium- and long-chain fatty acids and triglycerides in fecal fat, Clin Chem 19:499-505, 1973.

936 (Ventana-emergente - Popup)

Schwartz L, Woldow A, Dunsmore R:

Determination of fat tolerance in patients with myocardial infarction: method utilizing serum turbidity changes following a fat meal, JAMA 149:364-366, 1952.

937 (Ventana-emergente - Popup)

Silver S:

Radioactive isotopes in medicine and biology, Philadelphia, 1962, Lea & Febiger.

938 (Ventana-emergente - Popup)

Silver S:

Radioactive isotopes in medicine and biology, Philadelphia, 1962, Lea & Febiger.

939 (Ventana-emergente - Popup)

Kaihara S, Wagner HN Jr:

Measurement of intestinal fat absorption with carbon-14 labeled tracers, J Lab Clin Med 71:400-411, 1968.

940 (Ventana-emergente - Popup)

Benson JA, Culver PJ, Ragland S, et al:

The d-xylose absorption test in malabsorption syndromes, N Engl J Med 256:335-339, 1957.

941 (Ventana-emergente - Popup)

Santini R, Sheehy TW, Martinez-de-Jesus J:

The xylose tolerance test with a five-gram dose, Gastroenterology 40:772-774, 1961.

942 (Ventana-emergente - Popup)

Newcomer AD, McGill DB, Thomas PJ, Hofmann AF: Prospective comparison of indirect methods for detecting lactase deficiency, N Engl J Med 293:1232-1235, 1975.

943 (Ventana-emergente - Popup)

Deveney CW, Deveney KS, Jaffe BM, et al: Use of calcium and secretin in the diagnosis of gastrinoma, Ann Intern Med 87:680-686, 1979.

944 (Ventana-emergente - Popup)

Shahon BB, Horowitz S:

Cancer of the stomach: analysis of 1152 cases, Surgery 39:204-221, 1956.

945 (Ventana-emergente - Popup)

Parkinson CE, Gal I:

Factors affecting the lab management of human serum and liver vitamin A analysis, Clin Chim Acta 40:83-90, 1972.

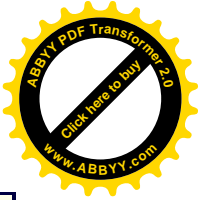
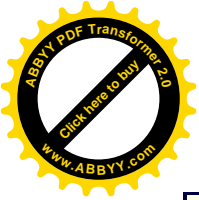
946 (Ventana-emergente - Popup)

Onstad GR, Zieve L:

Carotene absorption: a screening test for steatorrhea, JAMA 221:677-679, 1972.

947 (Ventana-emergente - Popup)

Parkinson CE, Gal I:



Factors affecting the lab management of human serum and liver vitamin A analysis, Clin Chim Acta 40:83-90, 1972.

948 (Ventana-emergente - Popup)

Erlanger BF, Kokowsky N, Cohen W:

The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin, Arch Biochem Biophys 95:271-278, 1961.

949 (Ventana-emergente - Popup)

Massion CG, McNeely MD:

Accurate micromethod for estimation of both medium- and long-chain fatty acids and triglycerides in fecal fat, Clin Chem 19:499-505, 1973.

950 (Ventana-emergente - Popup)

Winawer SJ, Sherlock P, Schottenfeld D, Miller DG: Screening for colon cancer, Gastroenterology 70:783-789, 1976.

951 (Ventana-emergente - Popup)

Christensen F, Anker N, Mondrop M:

Blood in feces: a comparison of the sensitivity and reproducibility of five chemical methods, Clin Chim Acta 57:23-27, 1974.

952 (Ventana-emergente - Popup)

Morris DW, Lee CS, Hansell JR:

Presentation at the annual meeting of the American Gastroenterological Society, San Francisco, 1974.

953 (Ventana-emergente - Popup)

Ward S, Gillespie IE, Passaro ER, et al:

Comparison of Histalog and histamine as stimulants for maximal gastric secretions in human subjects and in dogs, Gastroenterology 44:620-626, 1963.

954 (Ventana-emergente - Popup)

Gold P, Freedman SO:

Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system, J Exp Med 122:467-481, 1965.

955 (Ventana-emergente - Popup)

Meeker WR:

The use and abuse of the CEA test in clinical practice, Cancer 41:854-862, 1978.

956 (Ventana-emergente - Popup)

National Institutes of Health Consensus Conference: Carcinoembryonic antigen: its role as a marker in the management of cancer, Br Med J 282:373-375, 1981.

957 (Ventana-emergente - Popup)

Tracy RP, Wold LE, Jones JD, Burritt ME: Colorimetric vs. liquid-chromatographic determination of urinary 5-hydroxyindole-3-acetic acid, Clin Chem 27:160-162, 1981.

958 (Ventana-emergente - Popup)

Tracy RP, Wold LE, Jones JD, Burritt ME: Colorimetric vs. liquid-chromatographic determination of urinary 5-hydroxyindole-3-acetic acid, Clin Chem 27:160-162, 1981.

959 (Ventana-emergente - Popup)

Newman A:

Breath-analysis tests in gastroenterology, Gut 15:1-15, 1974.

960 (Ventana-emergente - Popup)

2620



McNeely MDD:

Breath test $^{14}\text{CO}_2$. In Pesce AJ, Kaplan LA, editors: Clinical chemistry: a laboratory and managers' infobase, Cincinnati, 1996, Pesce Kaplan Publishers.

961 (Ventana-emergente - Popup)

Baker PG, Barry RE, Read AE: Detection of continuing gluten ingestion in treated coeliac patients, Br Med J 1:486-488, 1975.

962 (Ventana-emergente - Popup)

Jones EA:

Immunoglobulins and the gut, Gut 13: 825-835, 1972.

963 (Ventana-emergente - Popup)

Stauffer JQ, Humphreys MH, Weir GJ: Acquired hyperoxaluria with regional enteritis after ileal resection, Ann Intern Med 79:383-391, 1973.

964 (Ventana-emergente - Popup)

Holdsworth CD:

Intestinal and pancreatic function. In Brown SS, Mitchell FL, Young DS, editors: Chemical diagnosis of disease, New York, 1980, Elsevier/North Holland.

965 (Ventana-emergente - Popup)

Rosenberg IH, Godwin HA:

The digestion and absorption of dietary folate, Gastroenterology 60:445-463, 1970.

966 (Ventana-emergente - Popup)

Kolhouse JF, Kondo H, Allen NC, et al:

Cobalamin analogues are present in human plasma and can mask cobalamin deficiency because current radioisotope dilution assays are not specific for true cobalamin, N Engl J Med 299:785-792, 1978.

967 (Ventana-emergente - Popup)

Schilling RF:

Intrinsic factor studies. II. The effect of gastric juice on the urinary excretion of radioactivity after the administration of vitamin B₁₂, J Lab Clin Med 42:860-866, 1953.

968 (Ventana-emergente - Popup)

Nickoloff E:

Schilling test: physiologic basis for and use as a diagnostic test, Crit Rev Clin Lab Sci 26:263-276, 1988.

969 (Ventana-emergente - Popup)

Streeter AM, Bathur FA, Arnold BJ, et al: Limitations of the Schilling test, Lancet 1:39-40, 1981.

970 (Ventana-emergente - Popup)

Katz JH, DiMase J, Donaldson RM Jr:

Simultaneous administration of gastric juice\Nbound and free radioactive cyanocobalamin, J Lab Clin Med 82:266, 1963.

971 (Ventana-emergente - Popup)

Atrah HI, Davidson RJ:

A survey and critical evaluation of a dual isotope (Dicopac) vitamin B₁₂ absorption test, Eur J Nucl Med 15:57-60, 1989.

972 (Ventana-emergente - Popup)



Atrah HI, Davidson RJ:

A survey and critical evaluation of a dual isotope (Dicopac) vitamin B₁₂ absorption test, *Eur J Nucl Med* 15:57-60, 1989.

973 (Ventana-emergente - Popup)

Heironimus JD, Borchert RD, Weiland FL:

The value of urine creatinine analysis in the evaluation on Schilling tests, *Clin Nucl Med* 15:181-182, 1990.

974 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Hurst JW et al, editors:

The heart, arteries, and veins, ed 6, New York, 1986, McGraw-Hill. Hearse DJ: *Enzymes in cardiology: diagnosis and research*, New York, 1979, Wiley & Sons.

975 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Hearse DJ:

Enzymes in cardiology: Diagnosis and research, New York, 1979, Wiley & Sons.

976 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Wu ABW:

Creatine kinase isoforms in ischemic heart disease, *Clin Chem* 35:7-13, 1989.

977 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Puleo PR, Guadagno PA, Roberts R, et al:

Early diagnosis of acute myocardial infarction based on assay for subforms of creatine kinase-MB, *Circulation* 82:759-764, 1990.

978 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Christenson RH, Ohman EM, Clemmenson P, et al:

Characteristics of creatine kinase-MB and the MB isoforms in serum after reperfusion in acute myocardial infarction, *Clin Chem* 35:2179-2185, 1989.

979 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Mair J, Dienstl F, Puschendorf B:

Cardiac troponin T in the diagnosis of myocardial injury, *Crit Rev Clin Lab Sci* 29:31-57, 1992.

980 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Apple FS:

Acute myocardial infarction and coronary reperfusion, *Am J Clin Pathol* 97:217-226, 1992.

981 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Bodor GS, Porter S, Landt Y, Ladenson JH:

Development of monoclonal antibodies for an assay of cardiac troponin-I and preliminary results in suspected cases of myocardial infarction, *Clin Chem* 38:2203-2214, 1992.

982 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Stryer L:

Biochemistry, ed 3, New York, 1988, WH Freeman & Company, pp 924-926.

983 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Nolan AC, Clark WA, Karoski T, Zak R: Patterns of cellular injury in myocardial ischemia determined by monoclonal antimyosin, *Proc Natl Acad Sci* 80:6046-6050, 12. 1983.

984 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Tears RD:

Asymmetrical hypertrophy of the heart in young adults, *Br Heart J* 20:1-8, 1958.

985 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Hurst JW et al, editors:

The heart, arteries, and veins, ed 6, New York, 1986, McGraw-Hill. Hearse DJ: *Enzymes in cardiology: diagnosis and research*, New York, 1979, Wiley & Sons.



986 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Wigle ED:

Hypercardiomiopathy, *Mod Concepts Cardiovasc Dis* 57:1-6, 1988.

987 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Elstein E, Liew CC, Sole MJ:

The genetic base of hypertrophic cardiomyopathy, *J Mol Cell Cardiol* 24:1471-1477, 1992.

988 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Weiss LM, Liu XF, Chang KL, Billingham ME:

Detection of enteroviral RNA in idiopathic dilated cardiomyopathy and other human cardiac tissues, *J Clin Invest* 90:156-159, 1992.

989 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Chou TC: *Electrocardiography in clinical practice*, New York, 1979, Grune & Stratton.

990 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Rouan GW, Lee TN, Cook EF, et al:

Clinical characteristics and outcome of acute myocardial infarction in patients with initial normal or nonspecific electrocardiograms, *Am J Cardiol* 64:1087-1092, 1989.

991 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Massie BM, Botvinick EH, Werner JA, et al:

Myocardial scintigraphy with technetium-99m stannous pyrophosphate: an insensitive test for nontransmural myocardial infarction, *Am J Cardiol* 43:186-192, 1979.

992 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Singh BN, Collett JT, Chew CYB:

New perspectives in the pharmacologic therapy of cardiac arrhythmias, *Prog Cardiovasc Dis* 224:243-301, 1980.

993 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Opie LH, editor:

Drugs for the heart, ed 2, Orlando, 1987, Grune & Stratton.

994 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Grenadier E, Keider S, Hahna L, et al: The rules of serum myoglobin, total CPK and CK-MB isoenzyme in the acute phase of myocardial infarction, *Am Heart J* 105:408-416, 1983.

995 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Drexel H, Dworzak E, Kirchmair W, et al: Myoglobinuria in the early phase of acute myocardial infarction, *Am Heart J* 105:642-651, 1983.

996 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Kagen L, Scheidt S, Butt A:

Serum myoglobin in myocardial infarction: the "staccato phenomenon," *Am J Med* 62:86-92, 1977.

997 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Guzy PM:

Creatinine phosphokinase-MB (CPK-MB) and the diagnosis of myocardial infarction, *West J Med* 127:445-460, 1977.

998 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Lott JA, Stang JM:

Serum enzymes and isoenzymes in the diagnosis and differential diagnosis of myocardial ischemia and necrosis, *Clin Chem* 26:1241-1250, 1980.

999 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Blomberg DJ, Kimber WD, Burkner MD: Creatine kinase isoenzymes: predictive value in the early diagnosis of

2623



myocardial infarction, *Am J Med* 59:464-469, 1975.

1000 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Neufeld HN, Rabinowitz B, Clejan S, et al: Isoenzymes of creatine phosphokinase in acute myocardial infarction, *Angiology* 28:853-864, 1977.

1001 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Mair J, Morandell D, Genser N, et al:

Equivalent early sensitivities of myoglobin, creatine kinase MB mass, creatine kinase isoform ratios, and troponin I and T for acute myocardial infarction, *Clin Chem* 41:1266-1272, 1995.

1002 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Irvin RG, Cobb FR, Roe CR:

Acute myocardial infarction and creatine phosphokinase, *Arch Intern Med* 140:329-334, 1980.

1003 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Hashimoto H, Abendschein DR, Strauss AW, et al:

Early detection of myocardial infarction in conscious dogs by analysis of plasma MM creatine kinase isoforms, *Circulation* 71:363-368, 1985.

1004 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Foxall CD:

Changes in creatine kinase and its isoenzymes in human fetal muscle during development, *J Neurol Sci* 24:483-492, 1975.

1005 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Galen RS, Gambino SR: *Beyond normality*, New York, 1975, Wiley & Sons.

1006 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Hamm CW, Ravkilde J, Gerhardt W, et al:

The prognostic value of serum troponin T in unstable, *N Engl J Med* 327:146-150, 1992.

1007 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Katus HA, Tsunehiro Y, Gold HK, et al:

Diagnosis of acute myocardial infarction by detection of circulating cardiac myosin light chains, *Am J Cardiol* 54:964-970, 1984.

1008 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Mair J, Artner-Dworzak E, Lechleitner P, et al: Cardiac troponin T in diagnosis of acute myocardial infarction, *Clin Chem* 37:845-852, 1991.

1009 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Horder M, Elser RC, Gerhardt W, et al:

IFCC methods for the measurement of catalytic concentrations of enzymes. Part 7. IFCC method for creatine kinase (ATP:creatine N-phospho-transferase, EC 2.7.3.2): IFCC recommendation, *Clin Chim Acta* 190:S4-S17, 1990.

1010 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Kuby SA, Noda L, Lardy HA:

Adenosine triphosphate\Ncreatine transphorylase, *J Biol Chem* 209:191-201, 1954.

1011 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Tanzer ML, Gilvarg C:

Creatine and creatine kinase measurement, *J Biol Chem* 234:3201-3204, 1966.

1012 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Oliver IT:

A spectrophotometric method for the determination of creatine phosphokinase and myokinase, *Biochem J* 61:116-122, 1955.

1013 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

2624



Rosalki SB:

An improved procedure for serum creatine phosphokinase determination, *J Lab Clin Med* 69:696-705, 1967.

1014 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Sax SM, Moore JS:

Fluorometric measurement of creatine kinase activity, *Clin Chem* 11:951-958, 1965.

1015 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Witteveen SAGJ, Sobel BE, DeLuca M: Kinetic properties of the isoenzymes of human creatine phosphokinase, *Proc Natl Acad Sci* 71:1384-1387, 1974.

1016 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Lott JA, Heinz JW:

Creatine kinase in serum. In Faulkner WR, Meites S, editors: *Selected methods for the small clinical chemistry laboratory*, Washington, D.C., 1982, American Association for Clinical Chemistry.

1017 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Frank JJ, Bermes EW, Bickel MJ, Watkins BF: Effect of in vitro hemolysis on chemical values for serum, *Clin Chem* 24:1966-1970, 1978.

1018 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Abbott LB, Lott JA:

Reactivation of serum creatine kinase isoenzyme BB in patients with malignancies, *Clin Chem* 30:1861-1863, 1984.

1019 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Morin LG:

Creatine kinase: stability, inactivation, reactivation, *Clin Chem* 23:646-652, 1977.

1020 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Henderson AR, McQueen MJ, Patten RL, et al:

Testing for creatine kinase and creatine kinase-2 in Ontario: reference ranges and assay types, *Clin Chem* 38:1365-1370, 1992.

1021 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Wong ET, Cobb C, Umehara MK, et al:

Heterogeneity of serum creatine kinase activity among racial and gender groups of the population, *Am J Clin Pathol* 79:582-586, 1983.

1022 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Foreback CC:

Biochemical diagnosis of myocardial infarction, *Henry Ford Hosp Med J* 39:159-164, 1991.

1023 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Lee TH, Goldman L:

Serum enzyme assays in the diagnosis of acute myocardial infarction, *Ann Intern Med* 105:221-233, 1986.

1024 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Brownlow K, Elevitch FR:

Serum creatine phosphokinase isoenzyme (CPK2) in myositis: a report of six cases, *JAMA* 230:1141-1144, 1974.

1025 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

El Allaf M, Chapelle J-P, El Allaf D, et al: Differentiating muscle damage from myocardial injury by means of the serum creatine kinase (CK) isoenzyme MB mass measurement/total CK activity ratio, *Clin Chem* 32:291-295, 1986.

1026 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)



Watson E, Kalman SM:

Assay of digoxin in plasma by gas chromatography, *J Chromatogr* 56:209, 1971.

1027 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Bertler A, Redfors A:

An improved method of estimating digoxin in human plasma, *Clin Pharmacol Ther* 11:665, 1970.

1028 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Butler VP Jr, Chen JP:

Digoxin specific antibody, *Proc Natl Acad Sci* 57:71, 1967.

1029 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Henderson DR, Friedman SB, Harris JD, et al. CEDIATM, a new homogenous immunoassay system, *Clin Chem* 32:1637-1641, 1986.

1030 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Leflar CC, Freytag JW, Powell LM, et al:

An automated, affinity-column mediated, enzyme-linked immunometric assay for digoxin on the DuPont aca discrete clinical analyzer, *Clin Chem* 30:1809-1811, 1984.

1031 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Morris RG, Frewin DB, Taylor WB, et al:

The effect of renal and hepatic impairment and of spironolactone on digoxin immunoassays, *Eur J Clin Pharmacol* 34:233-239, 1988.

1032 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Ray JE, Crisan D, Howrie DL:

Digoxin-like immunoreactivity in serum from neonates and infants reduced by centrifugal ultrafiltration and fluorescence polarization immunoassay, *Clin Chem* 37:94-98, 1991.

1033 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Lacarelle B, Durand A, Labadie N, Cano JP: Comparison of digoxin-like immunoreactive substance cross-reactivity with two digoxin automated immunoassays, *Ther Drug Monit* 11:725-727, 1989 [Letter].

1034 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Christenson RH, Studenberg SD, Beck-Davis S, Sedor FA: Digoxin-like immunoreactivity from serum by centrifugal ultrafiltration before fluorescence polarization immunoassay of digoxin, *Clin Chem* 33:606-608, 1987.

1035 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Pudek MR, Secombe DW, Jacobson BE, Whitfield MF: Seven different immunoassay kits compared with respect to interference by a digoxin-like immunoreactive substance in serum from premature and full-term infants, *Clin Chem* 29:1972-1974, 1983.

1036 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Phelps SJ, Kamper CA, Bottorff MB, Alpert BS:

Effect of age and serum creatinine on endogenous digoxin-like substances in infants and children, *J Pediatr* 110:136-139, 1987.

1037 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Wolach B, Carmi D, Shilo L, et al:

Endogenous digoxin-like factor in neonates: effect of age and relation to serum bilirubin levels, *Acta Paediatr Scand* 78:364-368, 1989.

1038 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Howell BF, McClure S, Schaffer R:

Lactate-to-pyruvate or pyruvate-to-lactate assay for lactate dehydrogenase: re-examination, *Clin Chem* 25:269-272, 1979.

1039 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)



Keiding R, Horder M, Gerhardt W, et al:

Recommended methods for determination of four enzymes in blood, *Scand J Clin Lab Invest* 33:291-306, 1974.

1040 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Demetriou JA, Drewes PA, Gin JB:

Enzymes. In Henry RJ, Cannon DC, Winkelman JW, editors: *Clinical chemistry: principles and techniques*, New York, 1974, Harper & Row.

1041 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Freer DE, Statland BE, Johnson M, Felton H:

Reference values for selected enzyme activities and protein concentrations in serum and plasma derived from cord-blood specimens, *Clin Chem* 25:565-569, 1979.

1042 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Buhl SN, Jackson KY:

Optimal conditions and comparison of lactate dehydrogenase catalysis of the lactate-to-pyruvate and pyruvate-to-lactate reactions in human serum at 25°, 30°, and 37° C, *Clin Chem* 24:828-831, 1978.

1043 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Mercer DW:

Simultaneous separation of serum creatine kinase and lactate dehydrogenase isoenzymes by ion-exchange column chromatography, *Clin Chem* 21:1102, 1975.

1044 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Mercer DS:

Improved column method for separating lactate dehydrogenase isoenzymes 1 and 2, *Clin Chem* 24:480, 1980.

1045 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Lima JJ, Lewis RP:

Procainamide therapeutic use and serum concentration monitoring. In Taylor WJ, Finn AL, editors: *Individualizing drug therapy: practical applications of drug monitoring*, vol 3, New York, 1981, Gross Townsend Frank, Inc.

1046 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Koch-Weser J, Klein SW:

Procainamide dosage schedules, plasma concentrations, and clinical effects, *JAMA* 215:1454-1460, 1971.

1047 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Ambler PK, Masarei JRL:

A new fluorometric method for procainamide, *Clin Chem Acta* 70:379-383, 1976.

1048 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Atkinson AJ Jr, Strong JM:

Effect of active drug metabolites on plasma level-response correlations, *J Pharmacokinet Biopharm* 5:95-109, 1977.

1049 (Ventana-emergente - Popup)

National Commission on Diabetes:

The long range plan to combat diabetes, U.S. Department of Health Education and Welfare, no 76-1018, Bethesda, Md., 1976, National Institutes of Health.

1050 (Ventana-emergente - Popup)

Harris MR, Hadden WC, Knowler WC, et al: Prevalence of diabetes and impaired glucose



tolerance and plasma levels in the U.S. population aged 20-74 yr, Diabetes 36:523, 1987.

1051 (Ventana-emergente - Popup)

Smith JW, Marcus FI, Serokman R, et al: Prognosis of patients with diabetes mellitus after myocardial infarction, Am J Cardiol 54:719, 1984.

1052 (Ventana-emergente - Popup)

Oppenheimer SM, Hoffbrand BI, Oswald GA, et al: Diabetes mellitus and early mortality from stroke, Br Med J 291:1014, 1985.

1053 (Ventana-emergente - Popup)

Froguel P, Zouali H, Vionnet N, et al:

Familial hyperglycemia due to mutations in glucokinase, N Engl J Med 328:697-702, 1993.

1054 (Ventana-emergente - Popup)

Cryer PE, Gerich JE:

Glucose counterregulation, hypoglycemia, and intensive insulin therapy in diabetes mellitus, N Engl J Med 131:232-241, 1985.

1055 (Ventana-emergente - Popup)

Chan SJ, Keim P, Steiner DF:

Cell-free synthesis of rat preproinsulin: characterization and partial amino acid sequence determination, Proc Natl Acad Sci USA 73:1964, 1976.

1056 (Ventana-emergente - Popup)

Unger RH, Orci L:

Glucagon and the A cell, N Engl J Med 304:1518-1524, 1575-1580, 1981.

1057 (Ventana-emergente - Popup)

Hartmann H, Probst I, Jungermann K, et al:

Inhibition of glycogenolysis and glycogen phosphorylase by insulin and proinsulin in rat hepatocyte cultures, Diabetes 36:551, 1987.

1058 (Ventana-emergente - Popup)

Cryer PE, Gerich JE:

Glucose counterregulation, hypoglycemia, and intensive insulin therapy in diabetes mellitus, N Engl J Med 131:232-241, 1985.

Dinneen S, Gerich J, Rizza R:

Carbohydrate metabolism in non- insulin-dependent diabetes mellitus, N Engl J Med 327:707-713, 1992.

1059 (Ventana-emergente - Popup)

National Diabetes Data Group:

Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance, Diabetes 28:1039-1057, 1979.

1060 (Ventana-emergente - Popup)

Harris MR, Hadden WC, Knowler WC, et al: Prevalence of diabetes and impaired glucose tolerance and plasma levels in the U.S. population aged 20-74 yr, Diabetes 36:523, 1987.

1061 (Ventana-emergente - Popup)

O'Sullivan JB, Worshop Y:

Subsequent morbidity among gestational diabetes women. In Sutherland HW, Stowers M, editors: Carbohydrate metabolism in pregnancy and the newborn, Edinburgh, 1984,



Churchill Livingstone.

1062 (Ventana-emergente - Popup)

Atkinson MA, Maclaren NK:

The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus, N Engl J Med 331:1428-1436, 1994.

1063 (Ventana-emergente - Popup)

Atkinson MA, Maclaren NK:

The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus, N Engl J Med 331:1428-1436, 1994.

Krolewski AS, Warram JH, Rand LI, Kahn CR: Epidemiologic approach to the etiology of type I diabetes mellitus and its complications, N Engl J Med 317:1390-1398, 1987.

1064 (Ventana-emergente - Popup)

Tiwari JL, Terasaki PI:

HLA and disease, New York, 1985, Springer-Verlag.

1065 (Ventana-emergente - Popup)

Baisch JM, Weeks T, Giles R, et al:

Analysis of HLA-DQ genotypes and susceptibility in insulin-dependent diabetes mellitus, N Engl J Med 322:1836, 1990.

1066 (Ventana-emergente - Popup)

Khalil I, d'Auriol L, Gobet M, et al:

A combination of HLA DQ beta Asp 57-negative and HLA DQ alpha Arg 52 confers susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus, J Clin Invest 85:1315, 1990.

1067 (Ventana-emergente - Popup)

Wicker LS, Miller J, Mullen Y:

Transfer of autoimmune diabetes mellitus with splenocytes from nonobese diabetic (NOD) mice, Diabetes 35:855, 1986.

1068 (Ventana-emergente - Popup)

Krolewski AS, Warram JH, Rand LI, Kahn CR:

Epidemiologic approach to the etiology of type I diabetes mellitus and its complications, N Engl J Med 317:1390-1398, 1987.

Gamble DR, Taylor KW:

Seasonal incidence of diabetes mellitus, Br Med J 3:631, 1969.

1069 (Ventana-emergente - Popup)

Hinden E:

Mumps followed by diabetes, Lancet 1:1381, 1962.

Johnson GM, Tudor RB:

Diabetes mellitus and congenital rubella infection, Am J Dis Child 120:453, 1970.

1070 (Ventana-emergente - Popup)

Yoon JW, Onodera T, Jenson AB, et al:

Virus induced diabetes mellitus. XI. Replication of Coxsackie B3 in human pancreatic beta cell cultures, Diabetes 27:778, 1978.

1071 (Ventana-emergente - Popup)

Craighead JE:

Does insulin dependent diabetes mellitus have a viral etiology? Hum Pathol 10:267,



1979.

1072 (Ventana-emergente - Popup)

Kasuga M, van Obberghen E, Yamada KM, Harrison LC: Autoantibodies against the insulin receptor recognize the insulin binding subunits of an oligomeric receptor, Diabetes 30:354, 1981.

1073 (Ventana-emergente - Popup)

Roth RA, Cassell DJ:

Insulin receptor: evidence that it is a protein kinase, Science 219:299, 1983.

1074 (Ventana-emergente - Popup)

Moller DE, Flier JS:

Insulin resistance-mechanisms, syndromes, and implications, N Engl J Med 325:938-948, 1991.

1075 (Ventana-emergente - Popup)

Bar RS, Gorden P, Roth J, et al:

Fluctuations in the affinity and concentration of insulin receptors on circulating monocytes of obese patients, J Clin Invest 58:1123, 1976.

1076 (Ventana-emergente - Popup)

Kasuga M, van Obberghen E, Yamada KM, Harrison LC: Autoantibodies against the insulin receptor recognize the insulin binding subunits of an oligomeric receptor, Diabetes 30:354, 1981.

1077 (Ventana-emergente - Popup)

Unger RH:

Diabetes hyperglycemia: link to impaired glucose transport in pancreatic beta cells, Science 251:1200, 1991.

1078 (Ventana-emergente - Popup)

Krolewski AS, Warram JH, Rand LI, Kahn CR: Epidemiologic approach to the etiology of type I diabetes mellitus and its complications, N Engl J Med 317:1390-1398, 1987.

Nathan DM:

Long-term complications of diabetes mellitus, N Engl J Med 328:1676-1685, 1993.

1079 (Ventana-emergente - Popup)

Understanding diabetic neuropathy, editorial, Lancet 338:1496-1497, Dec 14, 1991.

1080 (Ventana-emergente - Popup)

Bradley RF:

Cardiovascular disease. In Marble A, White P, Bradley RF, Krall LP, editors: Joslin's diabetes mellitus, ed 11, Philadelphia, 1971, Lea & Febiger.

1081 (Ventana-emergente - Popup)

Goldberg RB:

Lipid disorders in diabetes, Diabetes Care 4:561, 1981.

1082 (Ventana-emergente - Popup)

Lopes-Virella MFL, Stone PG, Colwell JA: Serum high den-sity lipoprotein in diabetic patients, 3 Diabetologia 13:285, 1977.

1083 (Ventana-emergente - Popup)

Smith JW, Marcus FI, Serokman R, et al: Prognosis of patients with diabetes mellitus after myocardial infarction, Am J Cardiol 54:719, 1984.



1084 (Ventana-emergente - Popup)

Zierler KL, Rabinowitz D:

Effect of very small concentrations of insulin on forearm metabolism: persistence of its action on potassium and free fatty acids without its effect on glucose, J Clin Invest 43:950, 1964.

1085 (Ventana-emergente - Popup)

The OCCT Research Group:

Epidemiology of severe hypoglycemia in the diabetes control and complications trial, Am J Med 90:450-459, 1991.

1086 (Ventana-emergente - Popup)

Polonsky KS:

A practical approach to fasting hypoglycemia [editorial], N Engl J Med 326:1020-1021, 1992.

1087 (Ventana-emergente - Popup)

Fischer KF, Lees JH, Newman JH: Hypoglycemia in hospitalized patients, N Engl J Med 315:1245-1250, 1986.

1088 (Ventana-emergente - Popup)

Miodovnik M, Mimouni F, Tsang RC, et al: Glycemic control and spontaneous abortion in insulin-dependent diabetic women, Obstet Gynecol 68:366-369, 1986.

1089 (Ventana-emergente - Popup)

Schwartz R:

Hyperinsulinemia and macrosomia, editorial, N Engl J Med 323:340-342, 1990.

1090 (Ventana-emergente - Popup)

Miodovnik M, Mimouni F, Tsang RC, et al: Glycemic control and spontaneous abortion in insulin-dependent diabetic women, Obstet Gynecol 68:366-369, 1986.

Schwartz R:

Hyperinsulinemia and macrosomia, editorial, N Engl J Med 323:340-342, 1990.

1091 (Ventana-emergente - Popup)

Cerami A, Stevens VJ, Monnier VM:

Role of nonenzymatic glycosylation in the development of the sequelae of diabetes mellitus, Metabolism 28:431, 1979.

1092 (Ventana-emergente - Popup)

Makita Z, Radoff S, Rayfield E, et al:

Advanced glycosylation end products in patients with diabetic nephropathy, N Engl J Med 325:836-841, 1991.

1093 (Ventana-emergente - Popup)

Kaneshige H:

Nonenzymatic glycosylation of serum IgG and its effect on antibody activity in patients with diabetes mellitus, Diabetes 36:822, 1987.

1094 (Ventana-emergente - Popup)

Cerami A, Stevens VJ, Monnier VM:

Role of nonenzymatic glycosylation in the development of the sequelae of diabetes



mellitus, Metabolism 28:431, 1979.

Makita Z, Radoff S, Rayfield E, et al:

Advanced glycosylation end products in patients with diabetic nephropathy, N Engl J Med 325:836-841, 1991.

Kaneshige H:

Nonenzymatic glycosylation of serum IgG and its effect on antibody activity in patients with diabetes mellitus, Diabetes 36:822, 1987.

1095 (Ventana-emergente - Popup)

Gabbay KH:

The sorbitol pathway and the complication of diabetes, N Engl J Med 288:831, 1973.

1096 (Ventana-emergente - Popup)

Notvest RR, Inerra JJ:

Tolrestat, an aldose reductase inhibitor, prevents nerve dysfunction in conscious diabetic rats, Diabetes 36:500, 1987.

1097 (Ventana-emergente - Popup)

Report on the Committee on Statistics of the American Diabetes Association:

Standardization of the oral glucose tolerance test, Diabetes 18:299, 1969.

1098 (Ventana-emergente - Popup)

Davidson MB:

The effect of aging on carbohydrate metabolism: a review of the English literature and a practical approach to the diagnosis of diabetes mellitus in the elderly, Metabolism 28:688, 1979.

1099 (Ventana-emergente - Popup)

Harris MI, Hadden WC, Knowler WC, et al: International criteria for the diagnosis of diabetes and impaired glucose tolerance, Diabetes Care 8:562, 1985.

1100 (Ventana-emergente - Popup)

National Diabetes Data Group:

Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance, Diabetes 28:1039-1057, 1979.

1101 (Ventana-emergente - Popup)

Sherwin RS:

Limitations of the oral glucose tolerance test in diagnosis of early diabetes, Primary Care 4:255, 1977.

Nelson RL:

Subspecialty clinics: endocrinology: oral glucose tolerance test: indications and limitations, Mayo Clin Proc 63:263-269, 1988.

1102 (Ventana-emergente - Popup)

Unger RH:

The standard two hour oral glucose tolerance test in the diagnosis of diabetes mellitus in subjects without fasting hyperglycemia, Ann Intern Med 47:1138, 1957.

1103 (Ventana-emergente - Popup)

Nelson RL:

Subspecialty clinics: endocrinology: oral glucose tolerance test: indications and limitations, Mayo Clin Proc 63:263-269, 1988.



1104 (Ventana-emergente - Popup)

Mauer AC:

The therapy of diabetes, Am Scientist 67:422, 1979.

1105 (Ventana-emergente - Popup)

Consensus Development Panel: Consensus statement on self-monitoring of blood glucose, Diabetes Care 10:95-99, 1987.

1106 (Ventana-emergente - Popup)

Gonen B, Rochman H, Rubenstein AH: Metabolic control in diabetic patients: assessment by hemoglobin A1 values, Metabolism 28:448, 1979.

1107 (Ventana-emergente - Popup)

Larsen ML, Horder MN, Mogensen EF:

Effect of long-term monitoring of glycosylated hemoglobin levels in insulin diabetes mellitus, N Engl J Med 323:1021-1025, 1990.

1108 (Ventana-emergente - Popup)

Dods RF, Bolmey C:

Glycosylated hemoglobin assay and oral glucose tolerance test compared for detection of diabetes mellitus, Clin Chem 25:764, 1979.

1109 (Ventana-emergente - Popup)

Guthrow CE, Morris MA, Day JF, et al: Enhanced nonenzymatic glucosylation of serum albumin in diabetes mellitus, Proc Natl Acad Sci USA 76:4528, 1979.

1110 (Ventana-emergente - Popup)

Ward WK, Beard JC, Halter JB, et al: Pathophysiology of insulin secretion in non-insulin-dependent diabetes mellitus, Diabetes Care 7:491, 1984.

1111 (Ventana-emergente - Popup)

Kundu SK, Judilla AM:

Novel solid-phase assay of ketone bodies in urine, Clin Chem 37:1565-1569, 1991.

1112 (Ventana-emergente - Popup)

Friedemann TE, Sheft BB, Miller VC:

An assessment of the value of nitroprusside reaction for the determination of ketone bodies in urine, Q Bull Northwestern Univ Med School 20:301-310, 1946.

Li PL, Lee JT, MacGilliray MH, et al:

Direct fixed-time kinetic assays for β -hydroxybutyrate and acetoacetate with a centrifugal analyzer or a computer-backed spectrophotometer, Clin Chem 26:1713-1717, 1980.

1113 (Ventana-emergente - Popup)

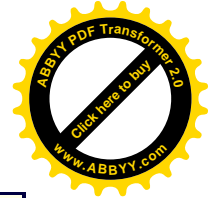
Kimura M, Kobayashi K, Matsuoka A, et al: Head-space gas chromatographic determination of 3-hydroxybutyrate in plasma after enzymic reactions, and the relationship among the three ketone bodies, Clin Chem 31:596-598, 1985.

1114 (Ventana-emergente - Popup)

Kimura M, Kobayashi K, Matsuoka A, et al: Head-space gas chromatographic determination of 3-hydroxybutyrate in plasma after enzymic reactions, and the relationship among the three ketone bodies, Clin Chem 31:596-598, 1985.

1115 (Ventana-emergente - Popup)

Brega A, Villa P, Quadrini G, et al: High-performance liquid chromatographic



determination of acetone in blood and urine in the clinical diagnostic laboratory, J Chromatogr 553:249-254, 1991.

1116 (Ventana-emergente - Popup)

Jerrard D, Verdile V, Yealy D, et al:

Serum determinations in toxic isopropanol ingestion, Am J Emerg Med 10:200-202, 1992.

1117 (Ventana-emergente - Popup)

Drews PA:

Carbohydrate derivatives and metabolites. In Henry RJ, Cannon D, Winkelman JW, editors: Clinical chemistry: principles and techniques, ed 2, Hagerstown, Md., 1974, Harper & Row.

1118 (Ventana-emergente - Popup)

Peden VH:

Determination of individual serum "ketone bodies," with normal values in infants and children, J Lab Clin Med 63:332-343, 1964.

1119 (Ventana-emergente - Popup)

Koch DD, Feldbruegge DH:

Optimized kinetic method for automated determination of β -hydroxybutyrate, Clin Chem 33:1761-1766, 1987.

1120 (Ventana-emergente - Popup)

Friedemann TE, Sheft BB, Miller VC:

An assessment of the value of nitroprusside reaction for the determination of ketone bodies in urine, Q Bull Northwestern Univ Med School 20:301-310, 1946.

1121 (Ventana-emergente - Popup)

Csako G, Benson CC, Elin RJ:

False-positive ketone reactions in CAP surveys, Clin Chem 39:915-917, 1993.

Poon R, Hinberg I:

One-step elimination of interference of free- sulfhydryl-containing drugs with Chemstrip ketone readings, Clin Chem 36:1527-1528, 1990.

Poon R, Hinberg I, Peterson RG:

N-Acetylcysteine causes false-positive ketone results with urinary dipsticks, Clin Chem 36:818-819, 1990.

1122 (Ventana-emergente - Popup)

Csako G:

False-positive results for ketone with the drug mesna and other free sulfhydryl compounds, Clin Chem 33:289-292, 1987.

Csako G:

Causes, consequences, and recognition of false-positive reactions for ketones, Clin Chem 36:1388-1389, 1990.

1123 (Ventana-emergente - Popup)

Schulke RE, Johnson RE:

A colorimetric method for estimating acetoacetate, Am J Clin Pathol 43:539-543, 1965.

1124 (Ventana-emergente - Popup)



Williamson DH, Mellanby J, Krebs HA: Enzymatic determination of D(-)- β -hydroxybutyric acid and acetoacetic acid in blood, Biochem J 82:90-96, 1962.

1125 (Ventana-emergente - Popup)

Williamson DH, Mellanby J, Krebs HA: Enzymatic determination of D(-)- β -hydroxybutyric acid and acetoacetic acid in blood, Biochem J 82:90-96, 1962.

1126 (Ventana-emergente - Popup)

Price CP, Lloyd B, Alberti KGMM:

A kinetic spectrophotometric assay for rapid determination of acetoacetate in blood, Clin Chem 23:1893-1897, 1977.

1127 (Ventana-emergente - Popup)

Yamanishi H, Iyama S, Yamaguchi Y, Amino N: Stability of acetoacetate after venesection, Clin Chem 39:920, 1993.

1128 (Ventana-emergente - Popup)

Greenberg LA, Lester D:

A micromethod for the determination of acetone and ketone bodies, J Biol Chem 154:177-190, 1944.

1129 (Ventana-emergente - Popup)

Seigel L, Robin NI, McDonald LJ: New approach to determination of total ketone bodies in serum, Clin Chem 23:46-49, 1977.

1130 (Ventana-emergente - Popup)

Dolnik V, Bocek P:

Determination of pyruvate, lactate, acetoacetate and β -hydroxybutyrate in serum by capillary iso-tachopheresis, J Chromatogr 225:455-458, 1991.

1131 (Ventana-emergente - Popup)

Eckfeldt JH, Leindecker-Foster C, Kershaw MJ: Calibration of 3-hydroxybutyrate assays, Clin Chem 30:1116, 1984.

1132 (Ventana-emergente - Popup)

Koch DD, Feldbruegge DH:

Optimized kinetic method for automated determination of β -hydroxybutyrate, Clin Chem 33:1761-1766, 1987.

1133 (Ventana-emergente - Popup)

Benedict SR:

Analysis of whole blood: determination of sugar and of saccharoids (nonfermentable copper-reducing substances), J Biol Chem 92:141-159, 1931.

1134 (Ventana-emergente - Popup)

Macquire GA, Price CP:

Evidence of interference by ascorbate in the measurement of cerebrospinal fluid glucose by a kinetic glucose oxidase/peroxidase procedure, Clin Chem 29:1810-1812, 1983.

Spector RN:

Vitamin homeostasis in the central nervous system, N Engl J Med 296:1393-1398, 1977.

1135 (Ventana-emergente - Popup)

Price CP, Spencer K:



A rapid kinetic assay for glucose using glucose dehydrogenase, Ann Clin Biochem 16:100-105, 1979.

1136 (Ventana-emergente - Popup)

Israngkun PP, Speicher CE: Glucose: review of methods, Am Soc Clin Pathol 7(3), 1991.

1137 (Ventana-emergente - Popup)

Giampietro O, Pilo A, Buzzigoli G, et al:

Four methods for glucose assay compared for various glucose concentrations and under different clinical conditions, Clin Chem 28:2405-2407, 1982.

1138 (Ventana-emergente - Popup)

Banauch D, Brummer W, Ebeling W, et al: Eine Glucose-Dehydrogenase für die Glucose-Bestimmung in Körperflüssigkeiten, Z Klin Chem Klin Biochem 13:101-107, 1975.

1139 (Ventana-emergente - Popup)

Pauly HEW, Pfeleiderer G:

D-Glucose dehydrogenase from Bacillus megaterium M 1286: purification, properties and structure, Hoppe-Seylers Z Physiol Chem 356:1613-1623, 1975.

1140 (Ventana-emergente - Popup)

Burrin JM, Price CP:

Performance of three enzymic methods for filter paper glucose determination, Ann Clin Biochem 21:411-416, 1984.

1141 (Ventana-emergente - Popup)

Meites, S:

Editor-in-chief: Pediatric clinical chemistry, reference values, Washington, D.C., 1989, American Association for Clinical Chemistry.

1142 (Ventana-emergente - Popup)

Breusch FL, Tulus R:

Die Spezifität der Mikromethoden zur Citronensäurebestimmung als Pentabromaceton, Biochim Biophys Acta 1:77, 1947.

1143 (Ventana-emergente - Popup)

Breusch FL, Tulus R:

Die Spezifität der Mikromethoden zur Citronensäurebestimmung als Pentabromaceton, Biochim Biophys Acta 1:77, 1947.

1144 (Ventana-emergente - Popup)

Hodge JE:

The Amadori rearrangement, Adv Carbohydr Chem 10:169, 1955.

1145 (Ventana-emergente - Popup)

Shapiro R, McManus MJ, Zalut C, et al: Sites of non-enzymatic glycosylation of human hemoglobin A, J Biol Chem 255:3120, 1980.

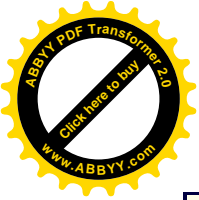
1146 (Ventana-emergente - Popup)

Abraham EC, Huff TA, Cope ND, et al: Determination of the glycosylated hemoglobins (HbA₁) with a new microcolumn procedure, Diabetes 27:931-937, 1978.

1147 (Ventana-emergente - Popup)

Menard L, Dempsey ME, Blankstein LA, et al: Quantitative determination of glycosylated hemoglobin A₁ by agar gel electrophoresis, Clin Chem 26:1598-1602, 1980.

1148 (Ventana-emergente - Popup)



Rosenthal MA:

The effect of temperature on the fast hemoglobin test system, Hemoglobin 3:215, 1979.

1149 (Ventana-emergente - Popup)

Goldstein DE, Little RR, Wiedmeyer H, et al: Glycated hemoglobin: methodologies and clinical applications, Clin Chem 32:B64-B70, 1986.

1150 (Ventana-emergente - Popup)

Fluckiger R, Harmon W, Meier W, et al: Hemoglobin carbamylation in uremia, N Engl J Med 304:823, 1981.

1151 (Ventana-emergente - Popup)

Hoberman HD, Chiodo SM:

Elevation of the hemoglobin A₁ fraction in alcoholism, Alcoholism: Clin Exp Res 6:260, 1982.

1152 (Ventana-emergente - Popup)

Weykamp CW, Penders TJ, Muskiet FAJ, et al: Influences of hemoglobin variants and derivatives on glycohemoglobin determinations as investigated by 102 laboratories using 16 methods, Clin Chem 39:1717-1723, 1993.

1153 (Ventana-emergente - Popup)

Javid J, Pettis PK, Koenig RJ, et al: Immunologic characterization and quantification of haemoglobin A_{1c}, Br J Haematol 38:329, 1978.

1154 (Ventana-emergente - Popup)

Menard L, Dempsey ME, Blankstein LA, et al: Quantitative determination of glycosylated hemoglobin A₁ by agar gel electrophoresis, Clin Chem 26:1598-1602, 1980.

1155 (Ventana-emergente - Popup)

Weykamp CW, Penders TJ, Muskiet FAJ, et al: Influences of hemoglobin variants and derivatives on glycohemoglobin determinations as investigated by 102 laboratories using 16 methods, Clin Chem 39:1717-1723, 1993.

1156 (Ventana-emergente - Popup)

Javid J, Pettis PK, Koenig RJ, et al: Immunologic characterization and quantification of haemoglobin A_{1c}, Br J Haematol 38:329, 1978.

1157 (Ventana-emergente - Popup)

John WG, Gray MR, Bates DK, et al: Enzyme immunoassay: a new technique for estimating hemoglobin A_{1c}, Clin Chem 39:663-666, 1993.

1158 (Ventana-emergente - Popup)

Pope RM, Aps JM, Page MD, et al: Immunologic characterization and quantification of haemoglobin A_{1c}, Diabetic Med 10:260-263, 1993.

1159 (Ventana-emergente - Popup)

Fluckiger R, Winterhalter KH:

Glycosylated hemoglobins. In Labie D, Poyart C, Rosa J, editors: Molecular interactions of hemoglobin, vol 70, Paris, 1977, Institut de la Santae et de la Recherche Maedical, pp 319-326.

1160 (Ventana-emergente - Popup)

Kennedy AL, Mehl TD, Merimee TJ: Non-enzymatically glycolated serum proteins: spurious elevation due to free glucose in serum, Diabetes 29:413, 1980.



1161 (Ventana-emergente - Popup)

Myrick JE, Gunter EW, Maggio VL, et al:

An improved radioimmunoassay of C-peptide and its application in a multi- year study, Clin Chem 35:37-42, 1989.

1162 (Ventana-emergente - Popup)

Arnqvist H, Ollson PO, von Schneck H:

Free and total insulin as determined after precipitation with polyethylene glycol: analytical characteristics and effects of sample handling and storage, Clin Chem 33:93-96, 1987.

1163 (Ventana-emergente - Popup)

Tsuji A, Maeda M, Arakawa H, et al:

Enzyme immunoassay of hormones and drugs by using fluorescence and chemiluminescence reaction. In Dal SB, editor: Enzyme labeled immunoassay of hormones and drugs, Berlin, New York, 1978, Walter de Gruyter & Co.

Yamaguchi Y, Hayashi C, Miyai K:

Fluorescence polarization immunoassay for insulin preparations, Anal Lett 15:731-737, 1982.

Toivonen E, Hemmilda I, Marniemi J, et al:

Two-side time-resolved immunofluorometric assay of human insulin, Clin Chem 32:637-640, 1986.

1164 (Ventana-emergente - Popup)

Andersen L, Dinesen B, Jorgensen PN, et al: Enzyme immunoassay for intact human insulin in serum or plasma, Clin Chem 39:578-582, 1993.

1165 (Ventana-emergente - Popup)

Koskinen P:

Nontransferability of C-peptide measurements with various commercial radioimmunoassay reagents, Clin Chem 34:1575-1578, 1988.

1166 (Ventana-emergente - Popup)

Malmquist J, Birgerstam G:

Assays of pancreatic B cell secretory products: utility in investigative and clinical diabetology, Scand J Clin Lab Invest 46:705-713, 1986.

1167 (Ventana-emergente - Popup)

Koskinen P:

Nontransferability of C-peptide measurements with various commercial radioimmunoassay reagents, Clin Chem 34:1575-1578, 1988.

1168 (Ventana-emergente - Popup)

Myrick JE, Gunter EW, Maggio VL, et al:

An improved radioimmunoassay of C-peptide and its application in a multi-year study, Clin Chem 35:37-42, 1989.

Koskinen P:

Nontransferability of C-peptide measurements with various commercial radioimmunoassay reagents, Clin Chem 34:1575-1578, 1988.

1169 (Ventana-emergente - Popup)

Duckworth WC, Hamel FG, Bennett R, et al: Human red blood cell insulin degrading



enzyme and rat skeletal muscle insulin protease share antigenic sites and generate identical products from insulin, J Biol Chem 265:2984-2987, 1990.

1170 (Ventana-emergente - Popup)

Boscato LM, Stuart C:

Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays, Clin Chem 34:27-33, 1988.

1171 (Ventana-emergente - Popup)

Walters E, Henley R, Barnes I:

Stability of insulin in normal whole blood, Clin Chem 32:224, 1986.

1172 (Ventana-emergente - Popup)

Fredrickson DS, Lees RS:

Familial hyperlipoproteinemia. In Stanbury JB, Wyngaarden JB, Fredrickson DS, editors: The metabolic basis of inherited disease, ed 3, New York, 1982, McGraw-Hill.

Fredrickson DS, Levy RJ, Lees RS:

Fat transport in lipoproteins: an integrated approach to mechanisms and disorders, N Engl J Med 276:32-44, 94-103, 148-156, 215-224, 273-281, 1967.

Gotto AM Jr, editor:

Plasma lipoproteins, New York, 1987, Elsevier Science Publishers.

Scanu AM, Spector AA, editors:

Biochemistry and biology of plasma lipoproteins, New York, 1986, Marcel Dekker.

1173 (Ventana-emergente - Popup)

Levy RJ, Rifkind BM, Dennis BH, Ernst N, editors: Nutrition, lipids, and coronary heart disease, New York, 1979, Raven Press.

1174 (Ventana-emergente - Popup)

Miller ME, Lewis B, editors: Lipoproteins, atherosclerosis and coronary heart disease, New York, 1981, American Elsevier Publishing.

1175 (Ventana-emergente - Popup)

Miller ME, Lewis B, editors: Lipoproteins, atherosclerosis and coronary heart disease, New York, 1981, American Elsevier Publishing.

1176 (Ventana-emergente - Popup)

Miller ME, Lewis B, editors: Lipoproteins, atherosclerosis and coronary heart disease, New York, 1981, American Elsevier Publishing.

1177 (Ventana-emergente - Popup)

Naito HK, editor:

Nutrition and heart disease, New York, 1982, Spectrum Publications, Inc.

1178 (Ventana-emergente - Popup)

The Expert Panel:

Report of the National Cholesterol Education Program expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults, Arch Intern Med 148:36-39, 1988.

1179 (Ventana-emergente - Popup)

Havel RJ:

Familial dysbeta- lipoproteinemia, Med Clin North Am 66(2):441-454, 1982.

1180 (Ventana-emergente - Popup)

National Heart, Lung, and Blood Institute Consensus Conference on Treatment of



Hypertriglyceridemia, JAMA 251:1196-1200, 1984.

1181 (Ventana-emergente - Popup)

Gotto AM Jr, editor:

Plasma lipoproteins, New York, 1987, Elsevier Science Publishers.

Scanu AM, Spector AA, editors:

Biochemistry and biology of plasma lipoproteins, New York, 1986, Marcel Dekker.

1182 (Ventana-emergente - Popup)

Fredrickson DS, Lees RS:

Familial hyperlipoproteinemia. In Stanbury JB, Wyngaarden JB, Fredrickson DS, editors: The metabolic basis of inherited disease, ed 3, New York, 1982, McGraw-Hill.

Fredrickson DS, Levy RJ, Lees RS:

Fat transport in lipoproteins: an integrated approach to mechanisms and disorders, N Engl J Med 276:32-44, 94-103, 148-156, 215-224, 273-281, 1967.

Levy RJ, Rifkind BM, Dennis BH, Ernst N, editors:

Nutrition, lipids, and coronary heart disease, New York, 1979, Raven Press.

Lewis LA, Opplt JJ, editors:

Handbook of electrophoresis, vol 1: Lipoproteinemia: basic principles and concepts; vol 2: Lipoproteins in disease, Boca Raton, Fla., 1980, CRC Press.

1183 (Ventana-emergente - Popup)

Lewis LA, editor:

Handbook of electrophoresis, vol 3: Lipoprotein methodology and human studies, Boca Raton, Fla., 1983, CRC Press.

1184 (Ventana-emergente - Popup)

Fredrickson DS, Lees RS:

Familial hyperlipoproteinemia. In Stanbury JB, Wyngaarden JB, Fredrickson DS, editors: The metabolic basis of inherited disease, ed 3, New York, 1982, McGraw-Hill.

Fredrickson DS, Levy RJ, Lees RS:

Fat transport in lipoproteins: an integrated approach to mechanisms and disorders, N Engl J Med 276:32-44, 94-103, 148-156, 215-224, 273-281, 1967.

Gotto AM Jr, editor:

Plasma lipoproteins, New York, 1987, Elsevier Science Publishers.

Scanu AM, Spector AA, editors:

Biochemistry and biology of plasma lipoproteins, New York, 1986, Marcel Dekker.

Lewis LA, Opplt JJ, editors:

Handbook of electrophoresis, vol 1: Lipoproteinemia: basic principles and concepts; vol 2: Lipoproteins in disease, Boca Raton, Fla., 1980, CRC Press.

1185 (Ventana-emergente - Popup)

Havel RJ:

Familial dysbeta- lipoproteinemia, Med Clin North Am 66(2):441-454, 1982.

1186 (Ventana-emergente - Popup)

Havel RJ:

Familial dysbeta- lipoproteinemia, Med Clin North Am 66(2):441-454, 1982.

1187 (Ventana-emergente - Popup)

Scanu AM:



Structural and functional polymorphism of lipoprotein(a): biological and clinical implications, Clin Chem 41:170-172, 1995.

1188 (Ventana-emergente - Popup)

The Expert Panel:

Report of the National Cholesterol Education Program expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults, Arch Intern Med 148:36-39, 1988.

Second Expert Panel:

Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel II), Circulation 89:1329-1445, 1994.

1189 (Ventana-emergente - Popup)

National Heart, Lung, and Blood Institute Consensus Conference on Treatment of Hypertriglyceridemia, JAMA 251:1196-1200, 1984.

Second Expert Panel:

Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel II), Circulation 89:1329-1445, 1994.

1190 (Ventana-emergente - Popup)

Fredrickson DS, Lees RS:

Familial hyperlipoproteinemia. In Stanbury JB, Wyngaarden JB, Fredrickson DS, editors: The metabolic basis of inherited disease, ed 3, New York, 1982, McGraw-Hill.

Fredrickson DS, Levy RJ, Lees RS:

Fat transport in lipoproteins: an integrated approach to mechanisms and disorders, N Engl J Med 276:32-44, 94-103, 148-156, 215-224, 273-281, 1967.

Gotto AM Jr, editor:

Plasma lipoproteins, New York, 1987, Elsevier Science Publishers.

Lewis LA, Oppl JJ, editors:

Handbook of electrophoresis, vol 1: Lipoproteinemia: basic principles and concepts; vol 2: Lipoproteins in disease, Boca Raton, Fla., 1980, CRC Press.

Lewis LA, editor:

Handbook of electrophoresis, vol 3: Lipoprotein methodology and human studies, Boca Raton, Fla., 1983, CRC Press.

1191 (Ventana-emergente - Popup)

Fredrickson DS, Lees RS:

Familial hyperlipoproteinemia. In Stanbury JB, Wyngaarden JB, Fredrickson DS, editors: The metabolic basis of inherited disease, ed 3, New York, 1982, McGraw-Hill.

Fredrickson DS, Levy RJ, Lees RS:

Fat transport in lipoproteins: an integrated approach to mechanisms and disorders, N Engl J Med 276:32-44, 94-103, 148-156, 215-224, 273-281, 1967.

1192 (Ventana-emergente - Popup)

Fredrickson DS, Lees RS:

Familial hyperlipoproteinemia. In Stanbury JB, Wyngaarden JB, Fredrickson DS, editors: The metabolic basis of inherited disease, ed 3, New York, 1982, McGraw-Hill.

Fredrickson DS, Levy RJ, Lees RS:



Fat transport in lipoproteins: an integrated approach to mechanisms and disorders, N Engl J Med 276:32-44, 94-103, 148-156, 215-224, 273-281, 1967.

Gotto AM Jr, editor:

Plasma lipoproteins, New York, 1987, Elsevier Science Publishers.

Lewis LA, Oppl JJ, editors:

Handbook of electrophoresis, vol 1: Lipoproteinemia: basic principles and concepts; vol 2: Lipoproteins in disease, Boca Raton, Fla., 1980, CRC Press.

Lewis LA, editor:

Handbook of electrophoresis, vol 3: Lipoprotein methodology and human studies, Boca Raton, Fla., 1983, CRC Press.

1193 (Ventana-emergente - Popup)

National Heart, Lung, and Blood Institute Consensus Conference on Treatment of Hypertriglyceridemia, JAMA 251:1196-1200, 1984.

Second Expert Panel:

Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel II), Circulation 89:1329-1445, 1994.

1194 (Ventana-emergente - Popup)

The Expert Panel:

Report of the National Cholesterol Education Program expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults, Arch Intern Med 148:36-39, 1988.

Second Expert Panel:

Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel II), Circulation 89:1329-1445, 1994.

1195 (Ventana-emergente - Popup)

National Heart, Lung, and Blood Institute Consensus Conference on Treatment of Hypertriglyceridemia, JAMA 251:1196-1200, 1984.

Second Expert Panel:

Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel II), Circulation 89:1329-1445, 1994.

1196 (Ventana-emergente - Popup)

Fredrickson DS, Lees RS:

Familial hyperlipoproteinemia. In Stanbury JB, Wyngaarden JB, Fredrickson DS, editors: The metabolic basis of inherited disease, ed 3, New York, 1982, McGraw-Hill.

Fredrickson DS, Levy RJ, Lees RS:

Fat transport in lipoproteins: an integrated approach to mechanisms and disorders, N Engl J Med 276:32-44, 94-103, 148-156, 215-224, 273-281, 1967.

1197 (Ventana-emergente - Popup)

The Expert Panel:

Report of the National Cholesterol Education Program expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults, Arch Intern Med 148:36-39, 1988.

Second Expert Panel:



Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel II), *Circulation* 89:1329-1445, 1994.

1198 (Ventana-emergente - Popup)

Fredrickson DS, Lees RS:

Familial hyperlipoproteinemia. In Stanbury JB, Wyngaarden JB, Fredrickson DS, editors: *The metabolic basis of inherited disease*, ed 3, New York, 1982, McGraw-Hill.

1199 (Ventana-emergente - Popup)

Naito HK, editor:

Nutrition and heart disease, New York, 1982, Spectrum Publications, Inc.

1200 (Ventana-emergente - Popup)

Kris-Etherton PM, editor-in-chief:

Risk factors for coronary heart disease. In *Cardiovascular disease: nutrition for prevention and treatment*, Chicago, Ill., 1990, American Dietetic Association.

1201 (Ventana-emergente - Popup)

The Expert Panel: Report of the National Cholesterol Education Program Expert Panel on Blood Cholesterol Levels in Children and Adolescents, U.S. Department of Health and Human Services, NIH publ no 91-2732, Bethesda, Md., Sept 1991, pp 1-119.

1202 (Ventana-emergente - Popup)

Gotto AM Jr, Farmer JA:

Risk factors for coronary artery disease. In Braunwald E, editor: *Heart disease: a textbook of cardiovascular medicine*, ed 3, Philadelphia, 1988, Saunders.

1203 (Ventana-emergente - Popup)

Gotto AM Jr, Farmer JA:

Risk factors for coronary artery disease. In Braunwald E, editor: *Heart disease: a textbook of cardiovascular medicine*, ed 3, Philadelphia, 1988, Saunders.

Ross R:

The pathogenesis of atherosclerosis. In Braunwald E, editor: *Heart disease: a textbook of cardiovascular medicine*, ed 3, Philadelphia, 1988, Saunders.

1204 (Ventana-emergente - Popup)

Naito HK:

18th Annual Symposium, National Academy of Clinical Biochemistry. Atherogenesis: current topics on etiology and risk factors, *Clin Chem* 41:132-133, 1995.

Zilversmit DB:

Atherogenic nature of triglycerides, postprandial lipidemia, and triglyceride-rich remnant, *Clin Chem* 41:153-158, 1995.

1205 (Ventana-emergente - Popup)

Ross R:

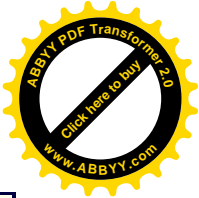
The pathogenesis of atherosclerosis. In Braunwald E, editor: *Heart disease: a textbook of cardiovascular medicine*, ed 3, Philadelphia, 1988, Saunders.

Strong JP:

Natural history and risk factors for early human atherogenesis, *Clin Chem* 41:143-138, 1995.

Wissler RW:

Theories and new horizons in the pathogenesis of atherosclerosis and the mechanisms



of clinical effects, Arch Pathol Lab Med 116:1281-1291, 1992.

1206 (Ventana-emergente - Popup)

Ross R:

The pathogenesis of atherosclerosis. In Braunwald E, editor: Heart disease: a textbook of cardiovascular medicine, ed 3, Philadelphia, 1988, Saunders.

1207 (Ventana-emergente - Popup)

Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, et al:

Beyond cholesterol: modifications of low-density lipoproteins that increase its atherogenicity, N Engl J Med 320:915-923, 1989.

1208 (Ventana-emergente - Popup)

Strong JP:

Natural history and risk factors for early human atherogenesis, Clin Chem 41:143-138, 1995.

1209 (Ventana-emergente - Popup)

Ross R:

The pathogenesis of atherosclerosis. In Braunwald E, editor: Heart disease: a textbook of cardiovascular medicine, ed 3, Philadelphia, 1988, Saunders.

1210 (Ventana-emergente - Popup)

Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, et al:

Beyond cholesterol: modifications of low-density lipoproteins that increase its atherogenicity, N Engl J Med 320:915-923, 1989.

1211 (Ventana-emergente - Popup)

Meade TW, Miller GJ, Rosenberg RD:

Characteristics associated with the risk of arterial thrombosis and the prethrombotic state. In Fuster V, Verstraete M, editors: Thrombosis in cardiovascular disorders, Philadelphia, 1992, Saunders.

1212 (Ventana-emergente - Popup)

Meade TW, Miller GJ, Rosenberg RD:

Characteristics associated with the risk of arterial thrombosis and the prethrombotic state. In Fuster V, Verstraete M, editors: Thrombosis in cardiovascular disorders, Philadelphia, 1992, Saunders.

1213 (Ventana-emergente - Popup)

Meade TW, Miller GJ, Rosenberg RD:

Characteristics associated with the risk of arterial thrombosis and the prethrombotic state. In Fuster V, Verstraete M, editors: Thrombosis in cardiovascular disorders, Philadelphia, 1992, Saunders.

1214 (Ventana-emergente - Popup)

NIH Consensus Development Conference: Lowering blood cholesterol to prevent heart disease, JAMA 253:2080-2086, 1985.

1215 (Ventana-emergente - Popup)

NIH Consensus Development Conference: Lowering blood cholesterol to prevent heart disease, JAMA 253:2080-2086, 1985.

1216 (Ventana-emergente - Popup)

The Expert Panel:



Report of the National Cholesterol Education Program expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults, Arch Intern Med 148:36-39, 1988.

Second Expert Panel:

Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel II), Circulation 89:1329-1445, 1994.

1217 (Ventana-emergente - Popup)

The Expert Panel:

Report of the National Cholesterol Education Program expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults, Arch Intern Med 148:36-39, 1988.

1218 (Ventana-emergente - Popup)

Second Expert Panel:

Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel II), Circulation 89:1329-1445, 1994.

1219 (Ventana-emergente - Popup)

The Expert Panel:

Report of the National Cholesterol Education Program Expert Panel on Blood Cholesterol Levels in Children and Adolescents, U.S. Department of Health and Human Services, NIH publ no 91-2732, Bethesda, Md., Sept 1991, pp 1-119.

1220 (Ventana-emergente - Popup)

Naito HK:

Cholesterol: review of methods, Check Sample PTS 85-I, Chicago, 1985, American Society of Clinical Pathology, pp. 1-17.

Naito HK:

Cholesterol. In the CD-ROM by Kaplan LA, Pesce AJ, editors: Clinical chemistry: a scientific and management infobase, Cincinnati, Ohio, 1996, Pesce Kaplan Publishers.

1221 (Ventana-emergente - Popup)

Naito HK:

Cholesterol. In the CD-ROM by Kaplan LA, Pesce AJ, editors: Clinical chemistry: a scientific and management infobase, Cincinnati, Ohio, 1996, Pesce Kaplan Publishers.

1222 (Ventana-emergente - Popup)

Kim E, Goldberg M:

Serum cholesterol assay using a stable Liebermann-Burchard reagent, Clin Chem 15:1171- 1179, 1969.

1223 (Ventana-emergente - Popup)

Abell LL, Levy BB, Brodie BB, Kendall FE: Simplified methods for the estimation of the total cholesterol in serum and demonstration of its specificity, J Biol Chem 195:357-366, 1952.

1224 (Ventana-emergente - Popup)

Pesce MA, Bodourian SH:

Interference with the enzymic measurement of cholesterol in serum by use of five reagent kits, Clin Chem 23:757-760, 1977.



1225 (Ventana-emergente - Popup)

Noma A, Nakayama K:

Polarographic method for rapid micro-determination of cholesterol with cholesterol esterase and cholesterol oxidase, Clin Chem 22:336-340, 1976.

1226 (Ventana-emergente - Popup)

The Expert Panel:

Report of the National Cholesterol Education Program expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults, Arch Intern Med 148:36-39, 1988.

1227 (Ventana-emergente - Popup)

Current status of blood cholesterol measurement in clinical laboratories in the United States: a report from the Laboratory Standardization Panel of the National Cholesterol Education Program, Clin Chem 34:193-201, 1988.

1228 (Ventana-emergente - Popup)

Current status of blood cholesterol measurement in clinical laboratories in the United States: a report from the Laboratory Standardization Panel of the National Cholesterol Education Program, Clin Chem 34:193-201, 1988.

1229 (Ventana-emergente - Popup)

Cooper GR:

High density lipoprotein reference materials. In Lipel K, editor: Report of the high density lipoprotein methodology workshop, DHEW publ no NIH 79-1661, Washington, D.C., 1979, U.S. Government Printing Office, p 178.

1230 (Ventana-emergente - Popup)

Kannel WB:

Low high-density lipoprotein cholesterol and what to do about it, Am J Cardiol 70:810-814, 1992.

1231 (Ventana-emergente - Popup)

Van Handel E, Zilversmit BD: Micromethod for the direct determination of triglycerides, J Lab Clin Med 50:152-157, 1957.

1232 (Ventana-emergente - Popup)

Levy RJ, Rifkind BM, Dennis BH, Ernst N, editors: Nutrition, lipids, and coronary heart disease, New York, 1979, Raven Press.

1233 (Ventana-emergente - Popup)

Naito HK, Kwak YS:

Evaluation of a new high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) technology: selective separation of lipoproteins by magnetic precipitation, Clin Chem 41:S135, 1995.

1234 (Ventana-emergente - Popup)

Lewis LA, editor:

Handbook of electrophoresis, vol 3: Lipoprotein methodology and human studies, Boca Raton, Fla., 1983, CRC Press.

1235 (Ventana-emergente - Popup)

Fredrickson DS, Lees RS:

Familial hyperlipoproteinemia. In Stanbury JB, Wyngaarden JB, Fredrickson DS,



editors: The metabolic basis of inherited disease, ed 3, New York, 1982, McGraw-Hill.

Fredrickson DS, Levy RJ, Lees RS:

Fat transport in lipoproteins: an integrated approach to mechanisms and disorders, N Engl J Med 276:32-44, 94-103, 148-156, 215-224, 273-281, 1967.

1236 (Ventana-emergente - Popup)

Lewis LA, editor:

Handbook of electrophoresis, vol 3: Lipoprotein methodology and human studies, Boca Raton, Fla., 1983, CRC Press.

1237 (Ventana-emergente - Popup)

Scanu AM, Spector AA, editors: Biochemistry and biology of plasma lipoproteins, New York, 1986, Marcel Dekker.

1238 (Ventana-emergente - Popup)

Van Handel E, Zilversmit BD:

Micromethod for the direct determination of triglycerides, J Lab Clin Med 50:152-157, 1957.

1239 (Ventana-emergente - Popup)

Naito HK:

Cholesterol. In the CD-ROM by Kaplan LA, Pesce AJ, editors: Clinical chemistry: a scientific and management infobase, Cincinnati, Ohio, 1996, Pesce Kaplan Publishers.

1240 (Ventana-emergente - Popup)

Bucolo G, David H:

Quantitative determination of serum tri-glycerides by the use of enzymes, Clin Chem 19:476-482, 1973.

1241 (Ventana-emergente - Popup)

Nagele U, Hagele EO, Sauer G, et al:

Reagent for the enzymatic determinations of serum total triglycerides with improved lipolytic efficiency, J Clin Chem Clin Biochem 22:165-174, 1984.

1242 (Ventana-emergente - Popup)

Naito HK, David JA:

Laboratory considerations: determination of cholesterol, triglyceride, phospholipid, and other lipids in blood and tissues. In Story JA, editor: Lipid research methodology, New York, 1984, Alan R Liss.

Stinshoff K, Weisshaar D, Staehler F, et al:

Relation between concentrations of free glycerol and triglycerides in human sera, Clin Chem 23:1029-1032, 1977.

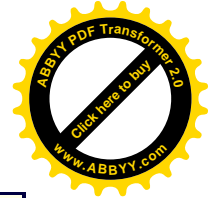
1243 (Ventana-emergente - Popup)

Naito HK, David JA:

Laboratory considerations: determination of cholesterol, triglyceride, phospholipid, and other lipids in blood and tissues. In Story JA, editor: Lipid research methodology, New York, 1984, Alan R Liss.

Lindblad BS, Settergren G, Feychting H, Persson B:

Total parenteral nutrition in infants: blood levels of glucose lactate, pyruvate, free fatty acids, glycerol, d-beta-hydroxybutyrate, triglycerides, free amino acids, and insulin, Acta Paediatr Scand 66:409-419, 1977.



1244 (Ventana-emergente - Popup)

Naito HK, David JA:

Laboratory considerations: determination of cholesterol, triglyceride, phospholipid, and other lipids in blood and tissues. In Story JA, editor: Lipid research methodology, New York, 1984, Alan R Liss.

1245 (Ventana-emergente - Popup)

Alper C:

Specimen collection and preservation. In Henry RJ, Cannon DC, Winkelman JW, editors: Clinical chemistry: principles and techniques, Hagerstown, Md., 1974, Harper & Row.

1246 (Ventana-emergente - Popup)

The Expert Panel:

Report of the National Cholesterol Education Program expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults, Arch Intern Med 148:36-39, 1988.

Second Expert Panel:

Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel II), Circulation 89:1329-1445, 1994.

1247 (Ventana-emergente - Popup)

Abell LL, Levy BB, Brodie BB, Kendall FE: Simplified methods for the estimation of the total cholesterol in serum and demonstration of its specificity, J Biol Chem 195:357-366, 1952.

1248 (Ventana-emergente - Popup)

Second Expert Panel: Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel II), Circulation 89:1329-1445, 1994.

1249 (Ventana-emergente - Popup)

US Bureau of the Census: Statistical abstract of the United States, 1975, Washington, D.C., 1975, US Government Printing Office.

1250 (Ventana-emergente - Popup)

Criteria Committee, National Council on Alcoholism: Criteria for the diagnosis of alcoholism, Ann Intern Med 77:249-258, 1972.

1251 (Ventana-emergente - Popup)

Bailey RJ, Krasner N, Feddleston ALW, et al: Histocompatibility antigens, autoantibodies, and immunoglobulins in alcoholic liver disease, Br Med J 2:727-729, 1976.

1252 (Ventana-emergente - Popup)

Mendenhall CL, Anderson S, Weesner RE, et al: Protein-calorie malnutrition associated with alcoholic hepatitis, Am J Med 76:221-222, 1984.

1253 (Ventana-emergente - Popup)

Hall P, editor:

Alcoholic liver disease: pathobiology, epidemiology, and clinical aspects, New York, 1985, Wiley & Sons.

1254 (Ventana-emergente - Popup)

Rydberg U, Skerfving S:

Toxicity of ethanol: a tentative risk evaluation. In Gross EM, editor: Alcohol



intoxication and withdrawal, New York, 1977, Plenum Publishing Corp.

1255 (Ventana-emergente - Popup)

Rydberg U, Skerfving S:

Toxicity of ethanol: a tentative risk evaluation. In Gross EM, editor: Alcohol intoxication and withdrawal, New York, 1977, Plenum Publishing Corp.

1256 (Ventana-emergente - Popup)

AMA Council on Scientific Affairs: Alcohol and the driver, JAMA 255: 522-527, 1986.

1257 (Ventana-emergente - Popup)

Zador PL:

Alcohol-related relative risk of fatal driver injuries in relation to driver age and sex, Arlington, Va., 1989, Insurance Institute for Highway Safety.

1258 (Ventana-emergente - Popup)

Kristensson H, Trell E, Eriksson S, et al: Serum- γ -glutamyl-transferase in alcoholism, Lancet 1:609, 1977.

Lieber CS:

Pathogenesis and early diagnosis of alcoholic liver injury, N Engl J Med 298:888-893, 1978.

1259 (Ventana-emergente - Popup)

Kristensson H, Trell E, Eriksson S, et al: Serum- γ -glutamyl-transferase in alcoholism, Lancet 1:609, 1977.

1260 (Ventana-emergente - Popup)

Mendenhall CL, Weesner RE: Alcohols and glycols. In Hanenson IB, editor: Quick reference to clinical toxicology, Philadelphia, 1980, JB Lippincott Co.

1261 (Ventana-emergente - Popup)

Lieber CS, DeCarli LM:

Effect of drug administration on the activity of the hepatic microsomal ethanol oxidizing system, Life Sci 9:267-276, 1970.

1262 (Ventana-emergente - Popup)

Lieber CS, DeCarli LM:

The role of the hepatic microsomal ethanol oxidizing system (MEOS) for ethanol metabolism in vivo, J Pharmacol Exp Ther 181:279-287, 1972.

1263 (Ventana-emergente - Popup)

Freytmans E, Leighton F:

Effects of pyrazole and 3-amino- 1,2,4-triazole on methanol and ethanol metabolism by the rat, Biochem Pharmacol 22:349-360, 1973.

1264 (Ventana-emergente - Popup)

Olin JS, Devenyi P, Weldon KL: Uric acid in alcoholics, Q J Study Alcohol 34:1202-1207, 1973.

1265 (Ventana-emergente - Popup)

Suter PM, Schutz Y, Jequier E.: The effect of ethanol on fat storage in healthy subjects, N Engl J Med 326:983-987, 1992.

1266 (Ventana-emergente - Popup)

Losowsky MS, Jones DP, Davidson CS, et al: Studies of alcoholic hyperlipemia and its mechanism, Am J Med 35:794-803, 1963.



1267 (Ventana-emergente - Popup)

Baraona E, Leo M, Borowsky SA, et al: Alcoholic hepatomegaly: accumulation of protein in the liver, Science 190:794-795, 1975.

1268 (Ventana-emergente - Popup)

Mendenhall CL, and the Cooperative Study Group on Alcoholic Hepatitis: Pathogenesis, diagnosis, and treatment of alcoholic hepatitis, Clin Gastroenterol 10:417-441, 1981.

1269 (Ventana-emergente - Popup)

Lieber CS, Jones DP, Losowsky MS, et al: Interrelation of uric acid and ethanol metabolism in man, J Clin Invest 41:1863-1970, 1962.

1270 (Ventana-emergente - Popup)

Olin JS, Devenyi P, Weldon KL:

Uric acid in alcoholics, Q J Study Alcohol 34:1202-1207, 1973.

1271 (Ventana-emergente - Popup)

Newcombe DS:

Ethanol metabolism and uric acid, Metabolism 21:1193-1203, 1972.

1272 (Ventana-emergente - Popup)

Pirola RC, Lieber CS:

The energy cost of the metabolism in drugs, including ethanol, Pharmacology 7:185-196, 1972.

1273 (Ventana-emergente - Popup)

Blackburn GL, Bristrian BR, Maini BS, et al: Nutritional and metabolic assessment of the hospitalized patient, J Parenter Ent Nutr 1:11-22, 1977.

1274 (Ventana-emergente - Popup)

Mendenhall CL, Anderson S, Weesner RE, et al: Protein-calorie malnutrition associated with alcoholic hepatitis, Am J Med 76:221-222, 1984.

1275 (Ventana-emergente - Popup)

Blackburn GL, Bristrian BR, Maini BS, et al: Nutritional and metabolic assessment of the hospitalized patient, J Parenter Ent Nutr 1:11-22, 1977.

1276 (Ventana-emergente - Popup)

Leevy CM, Thompson A, Baker H: Vitamins and liver injury, Am J Clin Nutr 23:493-498, 1970.

1277 (Ventana-emergente - Popup)

Frank O, Baker H, Leevy CM: Vitamin binding capacity of experimentally injured liver, Nature 203:302-303, 1964.

1278 (Ventana-emergente - Popup)

Leevy CM, Thompson A, Baker H: Vitamins and liver injury, Am J Clin Nutr 23:493-498, 1970.

1279 (Ventana-emergente - Popup)

Leevy, CM, ten Hove W, Frank O, et al: Folic acid deficiencies and hepatic DNA synthesis, Proc Soc Exp Biol Med 117:746-748, 1964.

1280 (Ventana-emergente - Popup)

Thomson AD, Majumdor SK:

The influence of ethanol on intestinal absorption and utilization of nutrients, Clin Gastroenterol 10:263-293, 1981.



1281 (Ventana-emergente - Popup)

Leevy CM, Thompson A, Baker H: Vitamins and liver injury, Am J Clin Nutr 23:493-498, 1970.

1282 (Ventana-emergente - Popup)

Leevy CML:

Liver regeneration in man, Springfield, Ill., 1973, Charles C. Thomas.

1283 (Ventana-emergente - Popup)

Thomson AD, Majumdar SK:

The influence of ethanol on intestinal absorption and utilization of nutrients, Clin Gastroenterol 10:263-293, 1981.

1284 (Ventana-emergente - Popup)

Leevy CM, Thompson A, Baker H: Vitamins and liver injury, Am J Clin Nutr 23:493-498, 1970.

1285 (Ventana-emergente - Popup)

McIntyre N, Morgan MY:

Nutritional aspects of liver disease. In Wright R, Alberti KGMM, Karran S, et al, editors: Liver and biliary disease, Philadelphia, 1979, Saunders.

1286 (Ventana-emergente - Popup)

Cohen JA, Kaplan MM:

The SGOT/SGPT ratio: an indicator of alcoholic liver disease, Dig Dis Sci 24:835-838, 1979.

1287 (Ventana-emergente - Popup)

Leevy CM, Thompson A, Baker H: Vitamins and liver injury, Am J Clin Nutr 23:493-498, 1970.

1288 (Ventana-emergente - Popup)

Herbert V, Zalusky R, Davidson CS: Correlation of folate deficiency with alcoholism and associated macrocytosis, anemia, and liver disease, Ann Intern Med 58:977-988, 1963.

1289 (Ventana-emergente - Popup)

Baker H, Frank O, Zetterman R, et al: Inability of chronic alcoholics with liver disease to use food as a source of folates, thiamin and vitamin B₆, Am J Clin Nutr 28:1377-1380, 1975.

1290 (Ventana-emergente - Popup)

Thomson AD, Majumdar SK:

The influence of ethanol on intestinal absorption and utilization of nutrients, Clin Gastroenterol 10:263-293, 1981.

1291 (Ventana-emergente - Popup)

Sullivan LW, Herbert V:

Suppression of hematopoiesis by ethanol, J Clin Invest 43:2048-2062, 1964.

1292 (Ventana-emergente - Popup)

Leevy CM, Thompson A, Baker H: Vitamins and liver injury, Am J Clin Nutr 23:493-498, 1970.

1293 (Ventana-emergente - Popup)

Thomson AD, Majumdar SK:

The influence of ethanol on intestinal absorption and utilization of nutrients, Clin Gastroenterol 10:263-293, 1981.



1294 (Ventana-emergente - Popup)

Beattie AD, Sherlock S: Ascorbic acid deficiency in liver disease, Gut 17:571-575, 1976.

1295 (Ventana-emergente - Popup)

McIntyre N, Morgan MY:

Nutritional aspects of liver disease. In Wright R, Alberti KGMM, Karran S, et al, editors: Liver and biliary disease, Philadelphia, 1979, Saunders.

1296 (Ventana-emergente - Popup)

Thomson AD, Majumdar SK:

The influence of ethanol on intestinal absorption and utilization of nutrients, Clin Gastroenterol 10:263-293, 1981.

1297 (Ventana-emergente - Popup)

McIntyre N, Morgan MY:

Nutritional aspects of liver disease. In Wright R, Alberti KGMM, Karran S, et al, editors: Liver and biliary disease, Philadelphia, 1979, Saunders.

1298 (Ventana-emergente - Popup)

Mendenhall CL, and the Cooperative Study Group on Alcoholic Hepatitis: Pathogenesis, diagnosis, and treatment of alcoholic hepatitis, Clin Gastroenterol 10:417-441, 1981.

1299 (Ventana-emergente - Popup)

McIntyre N, Morgan MY:

Nutritional aspects of liver disease. In Wright R, Alberti KGMM, Karran S, et al, editors: Liver and biliary disease, Philadelphia, 1979, Saunders.

1300 (Ventana-emergente - Popup)

Flink EB:

Mineral metabolism in alcoholism. In Kissin F, Begleiter H, editors: The biology of alcoholism, vol 1, Biochemistry, New York, 1971, Plenum Publishing.

1301 (Ventana-emergente - Popup)

Celada A, Rudolph H, Donath A:

Effect of experimental chronic alcohol ingestion and folic acid deficiencies on iron absorption, Blood 54:906-915, 1979.

1302 (Ventana-emergente - Popup)

Powell LW:

The role of alcoholism in hepatic iron storage disease, Ann NY Acad Sci 252:124-134, 1979.

1303 (Ventana-emergente - Popup)

McIntyre N, Morgan MY:

Nutritional aspects of liver disease. In Wright R, Alberti KGMM, Karran S, et al, editors: Liver and biliary disease, Philadelphia, 1979, Saunders.

1304 (Ventana-emergente - Popup)

Thomson AD, Majumdar SK:

The influence of ethanol on intestinal absorption and utilization of nutrients, Clin Gastroenterol 10:263-293, 1981.

1305 (Ventana-emergente - Popup)

Smith JC, McDaniel EG, Fan FF, et al: Zinc: a trace element essential in vitamin A metabolism, Science 181:954-955, 1973.



1306 (Ventana-emergente - Popup)

Flink EB:

Mineral metabolism in alcoholism. In Kissin F, Begleiter H, editors: The biology of alcoholism, vol 1, Biochemistry, New York, 1971, Plenum Publishing.

1307 (Ventana-emergente - Popup)

Thomson AD, Majumdor SK:

The influence of ethanol on intestinal absorption and utilization of nutrients, Clin Gastroenterol 10:263-293, 1981.

1308 (Ventana-emergente - Popup)

Thomson AD, Majumdor SK:

The influence of ethanol on intestinal absorption and utilization of nutrients, Clin Gastroenterol 10:263-293, 1981.

1309 (Ventana-emergente - Popup)

Flink EB:

Mineral metabolism in alcoholism. In Kissin F, Begleiter H, editors: The biology of alcoholism, vol 1, Biochemistry, New York, 1971, Plenum Publishing.

1310 (Ventana-emergente - Popup)

Kalbfleisch JM, Lindeman RD, Ginn HE, et al: Effects of ethanol administration on urinary excretion of magnesium and other electrolytes in alcoholic and normal subjects, J Clin Invest 42:1471-1475, 1963.

1311 (Ventana-emergente - Popup)

Jung RT, Davie M, Chalmers JO, et al: Abnormal vitamin D metabolism in cirrhosis, Gut 19:290-293, 1978.

1312 (Ventana-emergente - Popup)

Wolfe SM, Victor M:

The relationship of hypomagnesemia to alcohol withdrawal seizures and delirium tremens, Ann NY Acad Sci 162:973-984, 1969.

1313 (Ventana-emergente - Popup)

Knochel JP:

The pathophysiology and clinical characteristics of severe hypophosphatemia, Arch Intern Med 137:203-220, 1977.

1314 (Ventana-emergente - Popup)

Thomson AD, Majumdor SK:

The influence of ethanol on intestinal absorption and utilization of nutrients, Clin Gastroenterol 10:263-293, 1981.

1315 (Ventana-emergente - Popup)

Mathinos PR:

Determination of the proximal teratogen of the fetal alcohol syndrome in CD/Mice, doctoral dissertation, Cincinnati, 1982, University of Cincinnati.

1316 (Ventana-emergente - Popup)

Thomson AD, Bird GL, Saunders JB: Alcoholic liver disease, Gut, suppl: S97-103, Sept 1991.

1317 (Ventana-emergente - Popup)

Popper H:



The problem of hepatitis, Am J Gastroenterol 55:335-346, 1971.

1318 (Ventana-emergente - Popup)

Mendenhall CL, and the Cooperative Study Group on Alcoholic Hepatitis: Pathogenesis, diagnosis, and treatment of alcoholic hepatitis, Clin Gastroenterol 10:417-441, 1981.

1319 (Ventana-emergente - Popup)

Durbec JP, Sarles H:

Multicenter survey of the etiology of pancreatic diseases: the relationship between the relative risk of developing chronic pancreatitis and alcohol, protein, and lipid consumption, Digestion 18:337-350, 1970.

1320 (Ventana-emergente - Popup)

Camerson JL, Zuidema GD, Margolis S:

A pathogenesis for alcoholic pancreatitis, Surgery 77:754-763, 1975.

1321 (Ventana-emergente - Popup)

Durbec JP, Sarles H:

Multicenter survey of the etiology of pancreatic diseases: the relationship between the relative risk of developing chronic pancreatitis and alcohol, protein, and lipid consumption, Digestion 18:337-350, 1970.

1322 (Ventana-emergente - Popup)

Banks PA, editor:

Pancreatitis, ed 1, New York, 1979, Plenum Publishing.

1323 (Ventana-emergente - Popup)

Banks PA, editor:

Pancreatitis, ed 1, New York, 1979, Plenum Publishing.

Sarles H:

Chronic calcifying pancreatitis-chronic alcoholic pancreatitis, Gastroenterology 66:604-616, 1974.

1324 (Ventana-emergente - Popup)

Banks PA, editor:

Pancreatitis, ed 1, New York, 1979, Plenum Publishing.

1325 (Ventana-emergente - Popup)

Amman RW, Largiadès F, Akovbiantz A:

Pain relief by surgery in chronic pancreatitis? Relationship between pain relief, pancreatic dysfunction, and alcohol withdrawal, Scand J Gastroenterol 14:209-215, 1979.

1326 (Ventana-emergente - Popup)

DiMagno EP, Go VLW, Summerskill WHJ: Relationship between pancreatic enzyme outputs and malabsorption in severe pancreatic insufficiency, N Engl J Med 288:813-815, 1973.

1327 (Ventana-emergente - Popup)

Banks PA, editor:

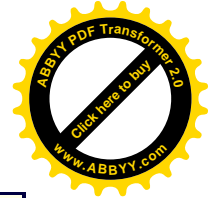
Pancreatitis, ed 1, New York, 1979, Plenum Publishing.

1328 (Ventana-emergente - Popup)

Marks V:

Alcohol and carbohydrate metabolism, Clin Endocrinol Metab 7:333-349, 1978.

1329 (Ventana-emergente - Popup)



Abel EL, Sokol RJ:

Incidence of fetal alcohol syndrome and economic impact of FAS-related abnormalities, Drug and Alcohol Dependence 19:51-70, 1987.

1330 (Ventana-emergente - Popup)

Schnek EA, Cohen J:

The heart in chronic alcoholism: clinical and pathologic findings, Pathol Microbiol 35:96-104, 1970.

1331 (Ventana-emergente - Popup)

Fisher VJ, Kavalier F:

The action of ethanol upon the contractility of normal ventricular myocardium. In Rothschild MA, Oratz M, Schreiber SS, editors: Alcohol and abnormal protein biosynthesis, Elmsford, N.Y., 1975, Pergamon Press.

1332 (Ventana-emergente - Popup)

Tamarin JS, Weiner S, Poppen R, et al: Alcohol and memory, Am J Psychol 127:1659-1667, 1971.

1333 (Ventana-emergente - Popup)

Sherlock S:

Alcohol and the liver: treatment, early recognition. In Sherlock S, editor: Diseases of the liver and biliary system, ed 6, London, 1981, Blackwell Scientific Publications.

1334 (Ventana-emergente - Popup)

Keller AZ, Terris M:

The association of alcohol and tobacco with cancer of the mouth and pharynx, Am J Public Health 55:1578-1585, 1965.

1335 (Ventana-emergente - Popup)

Keller AZ, Terris M:

The association of alcohol and tobacco with cancer of the mouth and pharynx, Am J Public Health 55:1578-1585, 1965.

1336 (Ventana-emergente - Popup)

Williams RR, Horm JW:

Association of cancer sites with tobacco and alcohol consumption and socioeconomic status of patients: interview study from the Third National Cancer Survey, J Natl Cancer Inst 58:525-547, 1977.

1337 (Ventana-emergente - Popup)

Williams RR, Horm JW:

Association of cancer sites with tobacco and alcohol consumption and socioeconomic status of patients: interview study from the Third National Cancer Survey, J Natl Cancer Inst 58:525-547, 1977.

1338 (Ventana-emergente - Popup)

Johnston DG, Alberti KGMM:

The liver and the endocrine system. In Wright R, Alberti KGMM, Karran S, et al, editors: Liver and biliary disease, Philadelphia, 1979, Saunders.

1339 (Ventana-emergente - Popup)

Jenkins JS, Connolly J: Adrenocortical response to ethanol in man, Br Med J 2:804-805, 1968.



1340 (Ventana-emergente - Popup)

Merry J, Marks V:

Hypothalamic-pituitary-adrenal function in chronic alcoholics. In Cross MM, editor: Alcohol intoxication and withdrawal: experimental studies, Advances in Experimental Medicine and Biology, New York, 1973, Plenum Publishing.

1341 (Ventana-emergente - Popup)

Johnston DG, Alberti KGMM:

The liver and the endocrine system. In Wright R, Alberti KGMM, Karran S, et al, editors: Liver and biliary disease, Philadelphia, 1979, Saunders.

1342 (Ventana-emergente - Popup)

Johnston DG, Alberti KGMM:

The liver and the endocrine system. In Wright R, Alberti KGMM, Karran S, et al, editors: Liver and biliary disease, Philadelphia, 1979, Saunders.

1343 (Ventana-emergente - Popup)

Chalmers RJ, Bennie EH, Johnson RH, et al: Growth hormone, prolactin and corticosteroid responses to insulin hypoglycaemia in alcoholics, Br Med J 2:745-748, 1978.

1344 (Ventana-emergente - Popup)

Johnston DG, Alberti KGMM:

The liver and the endocrine system. In Wright R, Alberti KGMM, Karran S, et al, editors: Liver and biliary disease, Philadelphia, 1979, Saunders.

1345 (Ventana-emergente - Popup)

Johnston DG, Alberti KGMM:

The liver and the endocrine system. In Wright R, Alberti KGMM, Karran S, et al, editors: Liver and biliary disease, Philadelphia, 1979, Saunders.

1346 (Ventana-emergente - Popup)

McIntyre N, Morgan MY:

Nutritional aspects of liver disease. In Wright R, Alberti KGMM, Karran S, et al, editors: Liver and biliary disease, Philadelphia, 1979, Saunders.

Wolfe SM, Victor M:

The relationship of hypomagnesemia to alcohol withdrawal seizures and delirium tremens, Ann NY Acad Sci 162:973-984, 1969.

1347 (Ventana-emergente - Popup)

McIntyre N, Morgan MY:

Nutritional aspects of liver disease. In Wright R, Alberti KGMM, Karran S, et al, editors: Liver and biliary disease, Philadelphia, 1979, Saunders.

1348 (Ventana-emergente - Popup)

Liu YK:

Leukopenia in alcoholics, Am J Med 54:605-610, 1973.

1349 (Ventana-emergente - Popup)

Cowan DH, Hines JD: Thrombocytopaenia of severe alcoholism, Ann Intern Med 74:37-43, 1971.

1350 (Ventana-emergente - Popup)

Johnston DG, Alberti KGMM:

The liver and the endocrine system. In Wright R, Alberti KGMM, Karran S, et al,



editors: Liver and biliary disease, Philadelphia, 1979, Saunders.

1351 (Ventana-emergente - Popup)

Thomas DP, Ream VJ, Stuart RK: Platelet aggregation in patients with Laennec's cirrhosis of the liver, *N Engl J Med* 276:1344-1348, 1967.

1352 (Ventana-emergente - Popup)

Mendenhall CL, and the Cooperative Study Group on Alcoholic Hepatitis: Pathogenesis, diagnosis, and treatment of alcoholic hepatitis, *Clin Gastroenterol* 10:417-441, 1981.

1353 (Ventana-emergente - Popup)

Chen T, Kanagasundaram N, Kakumu S, et al: Serum autoantibodies to alcoholic hyalin in alcoholic hepatitis [abstract], *Gastroenterology* A13:813, 1975.

1354 (Ventana-emergente - Popup)

Zinneman HH:

Autoimmune phenomena in alcoholic cirrhosis, *Am J Dig Dis* 20:337-345, 1970.

1355 (Ventana-emergente - Popup)

Bernstein IM, Webster KH, Williams RC Jr, et al: Reduction in circulating T lymphocytes in alcoholic liver disease, *Lancet* 2:488-490, 1974.

1356 (Ventana-emergente - Popup)

Hsu CCS, Leevy CM:

Inhibition of PHA-stimulated lymphocyte transformation by plasma from patients with advanced alcoholic cirrhosis, *Clin Exp Immunol* 8:749-760, 1971.

1357 (Ventana-emergente - Popup)

Hsu CCS, Leevy CM:

Inhibition of PHA-stimulated lymphocyte transformation by plasma from patients with advanced alcoholic cirrhosis, *Clin Exp Immunol* 8:749-760, 1971.

1358 (Ventana-emergente - Popup)

Kakumu S, Leevy CM:

Lymphocyte cytotoxicity in alcoholic hepatitis, *Gastroenterology* 72:524-526, 1977.

1359 (Ventana-emergente - Popup)

Mendenhall CL, Anderson S, Weesner RE, et al: Protein-calorie malnutrition associated with alcoholic hepatitis, *Am J Med* 76:221-222, 1984.

1360 (Ventana-emergente - Popup)

Mendenhall CL, and the Cooperative Study Group on Alcoholic Hepatitis: Pathogenesis, diagnosis, and treatment of alcoholic hepatitis, *Clin Gastroenterol* 10:417-441, 1981.

Smith WI Jr, Van Thiel DH, Whiteside T, et al:

Altered immunity in male patients with alcoholic liver disease: evidence for defective immune regulation, *Alcohol Clin Exp Res* 4:199-206, 1980.

1361 (Ventana-emergente - Popup)

Mendenhall CL, and the Cooperative Study Group on Alcoholic Hepatitis: Pathogenesis, diagnosis, and treatment of alcoholic hepatitis, *Clin Gastroenterol* 10:417-441, 1981.

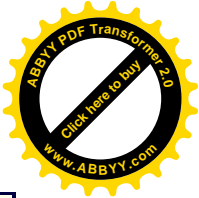
Kakumu S, Leevy CM:

Lymphocyte cytotoxicity in alcoholic hepatitis, *Gastroenterology* 72:524-526, 1977.

1362 (Ventana-emergente - Popup)

Sloan EP et al:

Toxicology screening in urban trauma patients: drug prevalence and its relationship to



trauma severity and management, J Trauma 29:1647-1652, 1989.

1363 (Ventana-emergente - Popup)

Fell JC, Nash CE:

The nature of the alcohol problem in the US fatal crashes, Health Educ Q 16:335-343, 1989.

1364 (Ventana-emergente - Popup)

National Highway Traffic Safety Administration: Fatal traffic crashes in 1987, Washington, D.C., 1988, NHTSA.

1365 (Ventana-emergente - Popup)

Mendenhall CL, and the Cooperative Study Group on Alcoholic Hepatitis: Pathogenesis, diagnosis, and treatment of alcoholic hepatitis, Clin Gastroenterol 10:417-441, 1981.

1366 (Ventana-emergente - Popup)

Mendenhall CL, and the Cooperative Study Group on Alcoholic Hepatitis: Pathogenesis, diagnosis, and treatment of alcoholic hepatitis, Clin Gastroenterol 10:417-441, 1981.

1367 (Ventana-emergente - Popup)

Pirola RC, Lieber CS:

The energy cost of the metabolism in drugs, including ethanol, Pharmacology 7:185-196, 1972.

1368 (Ventana-emergente - Popup)

Kaplan LA, editor:

Standards of laboratory practice: assessment of nutrition of hospitalized patients, Cincinnati, 1994, National Academy of Clinical Biochemistry.

1369 (Ventana-emergente - Popup)

Mendenhall CL, and the Cooperative Study Group on Alcoholic Hepatitis: Pathogenesis, diagnosis, and treatment of alcoholic hepatitis, Clin Gastroenterol 10:417-441, 1981.

1370 (Ventana-emergente - Popup)

Mendenhall CL, and the Cooperative Study Group on Alcoholic Hepatitis: Pathogenesis, diagnosis, and treatment of alcoholic hepatitis, Clin Gastroenterol 10:417-441, 1981.

1371 (Ventana-emergente - Popup)

Milstein HJ, Bloomer JR, Klatskin G: Serum bile acids in alcoholic liver disease, Am J Dig Dis 21:281-295, 1976.

1372 (Ventana-emergente - Popup)

Mendenhall CL, and the Cooperative Study Group on Alcoholic Hepatitis: Pathogenesis, diagnosis, and treatment of alcoholic hepatitis, Clin Gastroenterol 10:417-441, 1981.

1373 (Ventana-emergente - Popup)

Lundquist GAR:

Glucose tolerance in alcoholism, Br J Addict 61:51-55, 1965.

1374 (Ventana-emergente - Popup)

Marks V:

Alcohol and carbohydrate metabolism, Clin Endocrinol Metab 7:333-349, 1978.

1375 (Ventana-emergente - Popup)

Rees LH, Besser GM, Joffcoate WJ, et al: Alcohol-induced pseudo-Cushing's syndrome, Lancet 1:726-728, 1977.

1376 (Ventana-emergente - Popup)



Johnston DG, Alberti KGMM:

The liver and the endocrine system. In Wright R, Alberti KGMM, Karran S, et al, editors: Liver and biliary disease, Philadelphia, 1979, Saunders.

1377 (Ventana-emergente - Popup)

Joffe BI, Seftel HC, Van As M: Hormonal responses in ethanol-induced hypoglycaemia, J Stud Alcohol 36:550-554, 1975.

1378 (Ventana-emergente - Popup)

Marks V:

Alcohol and carbohydrate metabolism, Clin Endocrinol Metab 7:333-349, 1978.

1379 (Ventana-emergente - Popup)

Johnston DG, Alberti KGMM:

The liver and the endocrine system. In Wright R, Alberti KGMM, Karran S, et al, editors: Liver and biliary disease, Philadelphia, 1979, Saunders.

1380 (Ventana-emergente - Popup)

Joffe BI, Seftel HC, Van As M: Hormonal responses in ethanol-induced hypoglycaemia, J Stud Alcohol 36:550-554, 1975.

1381 (Ventana-emergente - Popup)

Joffe BI, Seftel HC, Van As M: Hormonal responses in ethanol-induced hypoglycaemia, J Stud Alcohol 36:550-554, 1975.

1382 (Ventana-emergente - Popup)

Arky RA, Freinkel N:

Alcohol hypoglycemia. V. Alcohol infusion to test gluconeogenesis in starvation, with specific reference to obesity, N Engl J Med 274:426-433, 1966.

1383 (Ventana-emergente - Popup)

Johnston DG, Alberti KGMM:

The liver and the endocrine system. In Wright R, Alberti KGMM, Karran S, et al, editors: Liver and biliary disease, Philadelphia, 1979, Saunders.

1384 (Ventana-emergente - Popup)

Marks V:

Alcohol and carbohydrate metabolism, Clin Endocrinol Metab 7:333-349, 1978.

1385 (Ventana-emergente - Popup)

O'Keefe SJ, Marks V:

Lunchtime gin and tonic, a cause of reactive hypoglycaemia, Lancet 1:1286-1288, 1977.

1386 (Ventana-emergente - Popup)

Johnston DG, Alberti KGMM:

The liver and the endocrine system. In Wright R, Alberti KGMM, Karran S, et al, editors: Liver and biliary disease, Philadelphia, 1979, Saunders.

1387 (Ventana-emergente - Popup)

Cooperman MT, Davidoff F, Spark R, et al: Clinical studies of alcoholic ketoacidosis, Diabetes 23:433-439, 1974.

1388 (Ventana-emergente - Popup)

Johnston DG, Alberti KGMM:

The liver and the endocrine system. In Wright R, Alberti KGMM, Karran S, et al,



editors: Liver and biliary disease, Philadelphia, 1979, Saunders.

1389 (Ventana-emergente - Popup)

Leevy CM, Smith F, Longueville J, et al: Indocyanine green clearance as a test for hepatic function: evaluation by dichromatic ear densitometry, JAMA 200:236-240, 1967.

1390 (Ventana-emergente - Popup)

Caplan YH:

Blood, urine, and other fluid and tissue specimens for alcohol analysis. In Garriott JC, editor: Medicolegal aspects of alcohol determination in biological specimens, Littleton, Mass., 1988, PSG (Mosby, St. Louis), pp 74-75.

1391 (Ventana-emergente - Popup)

Caplan YH:

Blood, urine, and other fluid and tissue specimens for alcohol analysis. In Garriott JC, editor: Medicolegal aspects of alcohol determination in biological specimens, Littleton, Mass., 1988, PSG (Mosby, St. Louis), pp 74-75.

1392 (Ventana-emergente - Popup)

Widmark EMP:

Modification of the Niclocex method for estimating ethyl alcohol, Skand Arch Physiol 35:125-130, 1916.

1393 (Ventana-emergente - Popup)

Bachand SS, Gaor MJ, Martel PA, O'Donnell CM: Alcohol detection by microdiffusion [Letter], Clin Chem 35:1269, 1989.

1394 (Ventana-emergente - Popup)

Yost DA, Boehnlein L, Shaffer M:

A novel assay to determine ethanol in whole blood on the Abbott TDX, Clin Chem 30:1029A, 1984.

1395 (Ventana-emergente - Popup)

Jortani SA, Poklis A:

Emit\R ETS\R plus ethyl alcohol assay for the determination of ethanol in human serum and urine, J Anal Toxicol 16:368-371, 1992.

1396 (Ventana-emergente - Popup)

Badcock NR, O'Reilly DA: False-positive EMIT\R-stTM ethanol screen with post-mortem infant plasma, Clin Chem 38:434, 1992.

1397 (Ventana-emergente - Popup)

Tagliaro F, Lubli G, Ghielmi S, et al: Chromatographic methods for blood and alcohol determination, J Chromatogr 580:161-190, 1992.

1398 (Ventana-emergente - Popup)

Bhagat CI, Beilby JP, Garcia-Webb P, Dusci LJ: Errors in estimating ethanol concentration in plasma by using the "osmolal gap," Clin Chem 31:647-648, 1985.

1399 (Ventana-emergente - Popup)

Winek CL, Paul LJ:

Effect of short-term storage conditions on alcohol concentrations in blood from living human subjects, Clin Chem 29:1959-1960, 1983.

1400 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Perrota G:

Iron and iron binding capacity. In Kaplan LA, Pesce AJ, editors: *Methods in clinical chemistry*, St. Louis, 2660



1987, Mosby.

1401 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Zak B, Baginski ES, Epstein E:

Modern iron ligands useful for the measurement of serum iron, *Ann Clin Lab Sci* 10:276-289, 1980.

1402 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Zak B, Baginski ES, Epstein E:

Modern iron ligands useful for the measurement of serum iron, *Ann Clin Lab Sci* 10:276-289, 1980.

1403 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Huisman W:

Interference of Imferon in colorimetric assays for iron, *Clin Chem* 26:635-637, 1980.

1404 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Jacobs JC, Alexander NM:

Colorimetry and constant-potential coulometry determinations of transferrin-bound iron, total iron binding capacity, and total iron in serum containing iron-dextran, with use of sodium dithionite and alumina columns, *Clin Chem* 36:1803-1807, 1990.

1405 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

McIntosh ME, Lynn JK, Meyerriecks N, et al:

Serum iron determination in patients receiving therapy with iron dextran ("Imferon"), *Clin Chem* 22:524-527, 1976.

1406 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Labbe D, Phung HT, Vassault A, et al:

Direct methods vs blanking methods for iron determination: effect of serum turbidity, *Clin Chem* 38:782-783, 1992.

1407 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Dorizzi R, Battaglia P, Lora A:

Iron measurement in patients with monoclonal immunoglobulin: a further caution, *Clin Chem* 37:589-590, 1991.

1408 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Bakker AJ:

Influence of monoclonal immunoglobulins in direct determinations of iron in serum, *Clin Chem* 37:690-694, 1991.

1409 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Vercammen M, Goedhuys W, Boeyckens A, et al:

Iron and total iron-binding capacity in serum of patients receiving iron-dextran: Kodak Ektachem methodologies, spectrophotometry, and atomic-absorption spectrometry compared, *Clin Chem* 36:1812-1815, 1990.

1410 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Bothwell TH, Charlton RW, Motulsky AG:

Hemochromatosis. In Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Walli D, editors: *The metabolic basis of inherited disease*, ed 6, New York, 1989, McGraw-Hill.

1411 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Watson CJ, Schwartz S:

Simple test for urinary porphobilinogen, *Proc Soc Exp Biol Med* 47:393-394, 1941.

1412 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

With TK:

Screening for acute porphyria, *Lancet* 2:1187-1188, 1970.

1413 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Moore DJ, Labbe RF:



A quantitative assay for urinary porphobilinogen, *Clin Chem* 10:1105-1111, 1964.

1414 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Hoesch K:

ber die Pantothenasaurebehandlung der Porphyrrie, *Dtsch Med Wochenschr* 72:252-254, 1947.

1415 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Pierach CA, Cardinal R, Bossenmaier I, Watson CJ:

Comparison of the Hoesch and the Watson-Schwartz tests for urinary porphobilinogen, *Clin Chem* 23:1666-1668, 1977.

1416 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Schreiber WE, Jamani A, Pudek MR:

Screening tests for porphobilinogen are insensitive: the problem and its solution, *Am J Clin Pathol* 92:644-649, 1989.

1417 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Schreiber WE:

ASCP Check Sample cc-252, Chicago, 1994, American Society of Clinical Pathologists.

1418 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Watson CJ, Bossenmaier I, Cardinal R:

Acute intermittent porphyria, *JAMA* 175:1087-1091, 1961.

1419 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Bunn HF, Forget BG:

Hemoglobin: molecular, genetic and clinical aspects, Philadelphia, 1986, Saunders.

1420 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Summers RN, Yerlley JC, Hyland VJ, et al:

Mapping the human a-globin gene complex to 16p13.2 → pter, *J Med Genet* 4:761, 1987.

1421 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Shaeffer JR:

Evidence for a difference in affinities of human hemoglobin b^A and b^S chains for a chains, *J Biol Chem* 255:2322, 1980.

1422 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Summers RN, Yerlley JC, Hyland VJ, et al:

Mapping the human a-globin gene complex to 16p13.2 → pter, *J Med Genet* 4:761, 1987.

1423 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Urbanetti JS:

Carbon monoxide poisoning. In Wallach DFH, editor: *The function of the red blood cells: erythrocyte pathobiology*, New York, 1981, Alan R Liss.

1424 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Schumacher HR:

Methemoglobinemia, sulfhemoglobinemia, and carboxy-hemoglobinemia. In Schumacher HR, Garvin DF, Triplett DA, editors, *Introduction to laboratory hematology and hematopathology*, New York, 1984, Alan R Liss.

1425 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Zijlstra WG, Buursma A, Meewisen van der Roest WP:

Absorption of human fetal and adult oxyhemoglobin, deoxyhemoglobin, carboxyhemoglobin, and methemoglobin, *Clin Chem* 37:1633, 1991.

1426 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Carrell RW, Winterbourn CC, Rachmilewitz EA:

Recommended methods for surface counting to determine sites of red cell destruction, *Br J Haematol* 30:250, 1975.



1427 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Finch CA:

Methemoglobinemia and sulfhemoglobinemia, *N Engl J Med* 239:470, 1948.

1428 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Dover GJ, Boyer SH, Zinkhorn WH:

Production of erythrocytes that contain fetal hemoglobin in anemia, *J Clin Invest* 63:173, 1979.

1429 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Hardisty RM, Speed DE, Till M:

Granulocytic leukemia in childhood, *Br J Haematol* 10:551, 1964.

1430 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Weatherall DJ, Pembrey ME, Pritchard J:

Fetal hemoglobin, *Clin Hematol* 3:467, 1974.

1431 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Weatherall DJ, Clegg JB:

The thalassemia syndrome, Oxford, England, 1981, Blackwell Scientific Publications.

1432 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Fairbanks VF:

Nomenclature and taxonomy of hemoglobin variants. In Fairbanks VF, editor: *Hemoglobinopathies and thalassemias*, New York, 1980, Brian C Decker, Publisher.

1433 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Westhall DJ:

Abnormal hemoglobins and thalassemias. In Hoffbrand AV, Brain MC, Hirsh J, editors: *Recent advances in hematology*, London, 1977, Churchill Livingstone.

1434 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Lubin BH, Witkowska HE, Kleman K:

Laboratory diagnosis of hemoglobinopathies, *Clin Biochem* 24:363-374, 1991.

1435 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Buihl RW:

Physical chemical properties of sickle cell hemoglobin. In Wallach DPH, editor: *The function of red blood cells: erythrocyte pathobiology*, New York, 1981, Alan R. Liss.

1436 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Ranney HM:

The spectrum of sickle cell disease, *Hosp Pract* (off Ed) 27: pp 133-137, 141-144, 149-150 passim, Jan 15, 1992.

1437 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Bunn HF:

Hemoglobin II, sickle cell anemia and other hemoglobinopathies. In Beck WS, editor: *Hematology*, Cambridge, Mass., 1981, MIT Press.

1438 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Nagel RL, Bookchin RM:

Oxygen transport and the sickle cell. In Wallach DFH, editor: *The function of red blood cells: erythrocyte pathobiology*, New York, 1981, Alan R. Liss.

1439 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Nagel RL, Bookchin RM:

Oxygen transport and the sickle cell. In Wallach DFH, editor: *The function of red blood cells: erythrocyte pathobiology*, New York, 1981, Alan R. Liss.

1440 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Weatherall DJ, Clegg JB:



The thalassemia syndrome, Oxford, England, 1981, Blackwell Scientific Publications.

1441 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Kark JA, Posey DM, Schumacher HR, et al:

Sickle cell trait as a risk factor for sudden death in basic training, *N Engl J Med* 317:781, 1987.

1442 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Charache S:

Fetal hemoglobin, sickling and sickle cell disease, *Adv Pediatr* 37:1, 1990.

1443 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Testa V, Dubait A, Hinard N, et al:

Beta⁰-thalassemia/HbE association, *Acta Haematol* 64:42, 1980.

1444 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Ohba Y:

Unstable hemoglobins, *Hemoglobin* 14:353, 1990.

1445 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Kreimer-Birnbaum M, Pinkerton PH, Bannerman RM, et al:

Dipyrrolic urinary pigments in congenital Heinz-body anemia due to Hb Köln and in thalassemia, *Br J Med* 2:396, 1966.

1446 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Weatherall DJ, Clegg JB:

The thalassemia syndrome, Oxford, England, 1981, Blackwell Scientific Publications.

Fairbanks VF:

Thalassemias and hereditary persistence of fetal hemoglobins (HPFH). In Fairbanks VF, editor: *Hemoglobinopathies and thalassemias, laboratory methods and case studies*, New York, 1980, Brian C Decker, Publisher.

1447 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Weatherall DJ, Clegg JB:

The thalassemia syndrome, Oxford, England, 1981, Blackwell Scientific Publications.

1448 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Fairbanks VF:

Thalassemias and hereditary persistence of fetal hemoglobins (HPFH). In Fairbanks VF, editor: *Hemoglobinopathies and thalassemias, laboratory methods and case studies*, New York, 1980, Brian C Decker, Publisher.

1449 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Okene-Frempong K, Schwartz E:

Clinical features of thalassemia, *Pediatr Clin North Am* 27:403, 1980.

1450 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Fairbanks VF:

Thalassemias and hereditary persistence of fetal hemoglobins (HPFH). In Fairbanks VF, editor: *Hemoglobinopathies and thalassemias, laboratory methods and case studies*, New York, 1980, Brian C Decker, Publisher.

1451 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Weatherall DJ, Clegg JB:

The thalassemia syndrome, Oxford, England, 1981, Blackwell Scientific Publications.

1452 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Okene-Frempong K, Schwartz E:

Clinical features of thalassemia, *Pediatr Clin North Am* 27:403, 1980.

1453 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)



Fairbanks VF:

Thalassemias and hereditary persistence of fetal hemoglobins (HPFH). In Fairbanks VF, editor: *Hemoglobinopathies and thalassemias, laboratory methods and case studies*, New York, 1980, Brian C Decker, Publisher.

1454 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Charache S, Clegg JB, Weatherall DJ:

The Negro variety of hereditary persistence of fetal haemoglobin in a mild form of thalassemia, *Br J Haematol* 34:527, 1976.

1455 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Charache S, Clegg JB, Weatherall DJ:

The Negro variety of hereditary persistence of fetal haemoglobin in a mild form of thalassemia, *Br J Haematol* 34:527, 1976.

1456 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Weatherall DJ, Clegg JB:

Hereditary persistence of fetal haemoglobin, *Br J Haematol* 29:191, 1975.

1457 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Jaffe ER:

Methemoglobinemia, *Clin Hematol* 10:99, 1981, specific p 103.

1458 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Jaffe ER:

Methemoglobinemia, *Clin Hematol* 10:99, 1981, specific p 117.

1459 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Jaffe ER:

Methemoglobinemia, *Clin Hematol* 10:99, 1981, specific p 117.

1460 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Dover GJ, Boyer SH, Zinkhorn WH:

Production of erythrocytes that contain fetal hemoglobin in anemia, *J Clin Invest* 63:173, 1979.

1461 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Hardisty RM, Speed DE, Till M:

Granulocytic leukemia in childhood, *Br J Haematol* 10:551, 1964.

Weatherall DJ, Pembrey ME, Pritchard J:

Fetal hemoglobin, *Clin Hematol* 3:467, 1974.

1462 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Bunn HF, Haney DN, Kain S, et al:

The biosynthesis of human hemoglobin A_{1c}, *J Clin Invest* 57:1652, 1976.

1463 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Landau SA, Winchell HS:

Endogenous production of ¹⁴CO: a method for calculation of RBC life-span in vivo, *Blood* 36:642, 1970.

1464 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Astrup P:

Carbon monoxide inhalation-time for clearance from blood in reversible coma, *JAMA* 230:1064, 1974.

1465 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Smith JR, Landau SA:

Smoker's polycythemia, *N Engl J Med* 298:6, 1978.

1466 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

van Lente F, Marchand A, Galen RS:

Evaluation of a nephelometric assay for haptoglobin and its clinical usefulness, *Clin Chem* 25:2007, 1979.



1467 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Sternberg JC:

A rate nephelometer for measuring specific proteins by immunoprecipitin reactions, *Clin Chem* 23:1456, 1977.

1468 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Sternberg JC:

A rate nephelometer for measuring specific proteins by immunoprecipitin reactions, *Clin Chem* 23:1456, 1977.

1469 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Schrijver J, van Rijn H, Schreurs W:

Re-evaluation of the haptoglobin reference values with the radial immunodiffusion technique, *Clin Biochem* 17:258, 1984.

1470 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Wood WG, Stamatoyannopoulos G, Lim G, Nute PE:

F-cells in the adult: normal values and levels in individuals with hereditary and acquired elevations of HbF, *Blood* 46:671-682, 1975.

Apt L, Downey WS Jr:

"Melena" neonatorum: the swallowed blood syndrome, *J Pediatr* 47:6-12, 1955.

1471 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Liu N, Wu AB, Wong SS:

Improved quantitative Apt test for detecting fetal hemoglobin in bloody stools of newborns, *Clin Chem* 39:2326-2329, 1993.

1472 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Wood WG, Stamatoyannopoulos G, Lim G, Nute PE:

F-cells in the adult: normal values and levels in individuals with hereditary and acquired elevations of HbF, *Blood* 46:671-682, 1975.

1473 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Garver FA, Jones CS, Baker MM, et al:

Specific radioimmunochemical identification and quantitation of hemoglobins A₂ and F, *Am J Hematol* 1:459-469, 1976.

1474 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Chudwin DS, Rucknagel DL:

Immunological quantification of hemoglobins F and A₂, *Clin Chim Acta* 50:413-418, 1974.

1475 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Makler MT, Pesce AJ:

ELISA assay for measurement of human hemoglobin A and hemoglobin F, *Am J Clin Pathol* 74:673-676, 1980.

1476 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Turpeinen U, Stenman U-H:

Determination of fetal hemoglobin by time-resolved immunofluorometric assay, *Clin Chem* 38:2013-2018, 1992.

1477 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Brunnekreeft JW, Eidhof HH:

Improved rapid procedure for simultaneous determinations of hemoglobins A1a, A1b, A1c, F, C, and S, with indication for acetylation or carbamylation by cation-exchange liquid chromatography, *Clin Chem* 39:2514-2518, 1993.

1478 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Tan GB, Aw TC, Dunstan RA, Lee SH:

Evaluation of high performance liquid chromatography for routine estimation of hemoglobins A₂ and F, *J Clin*



Pathol 46:852-856, 1993.

1479 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Garver FA, Jones CS, Baker MM, et al:

Specific radiochemical identification and quantitation of hemoglobins A₂ and F, *Am J Hematol* 1:459-469, 1976.

1480 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Nalbandian RM, Nichols BM, Camp FR Jr, et al:

Dithionite tube test, a rapid inexpensive technique for the detection of hemoglobins S and non-S sickling hemoglobin, *Clin Chem* 17:1028-1032, 1971.

1481 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Gottfried EI, Wall B, Robertson NA:

Reliable estimation of hemoglobin A₂ concentration by electrophoresis with densitometry, *Am J Clin Pathol* 72:415-420, 1979.

1482 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Huntsman RG:

Sickling tests, microscopic and non-microscopic. In Schmidt RM, Husman THJ, Lehmann H, et al, editors: *The detection of hemoglobinopathies*, Cleveland, 1988, CRC Press.

1483 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

McFadzean JA:

The effect of phenothiazines on the sickling phenomenon in vitro, *Br J Haematol* 16:173, 1969.

1484 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Sonnenwirth AC, Jarett L:

Gradwohl's clinical laboratory methods and diagnosis, ed 8, vol 1, St. Louis, 1980, Mosby.

1485 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Sonnenwirth AC, Jarett L:

Gradwohl's clinical laboratory methods and diagnosis, ed 8, vol 1, St. Louis, 1980, Mosby.

Miale JB:

Laboratory medicine hematology, ed 5, St. Louis, 1982, Mosby.

Lubin BH, Witkowska HE, Kleman K:

Laboratory diagnosis of hemoglobinopathies, *Clin Biochem* 24:363-374, 1991 (review).

1486 (Ventana-emergente - Popup)

Recommended Dietary Allowances, 10th edition, Subcommittee on the 10th Edition of the RDAs, Food and Nutrition Board, Commission on Life Sciences, National Research Council, National Academy Press, Washington, D.C., 1989.

1487 (Ventana-emergente - Popup)

World Health Organization:

Energy and protein requirements, report of a joint FAO/WHO/UNU expert consultation technical report, series 724, Geneva, 1985, WHO.

Souba WW, Wilmore DW:

Diet and nutrition in the care of the patient with surgery trauma and sepsis. In Shils, ME, Olson JA, Shike M, editors: *Modern nutrition in health and disease*, ed 8, Philadelphia, 1993, Lea & Febiger.

1488 (Ventana-emergente - Popup)

World Health Organization:

Energy and protein requirements, report of a joint FAO/WHO/UNU expert consultation technical report, series 724, Geneva, 1985, WHO.



1489 (Ventana-emergente - Popup)

MacDonald I: Carbohydrates.

In Shils ME, Olson JA, Shike M, editors: Modern nutrition in health and disease, ed 8, Philadelphia, 1993, Lea & Febiger.

1490 (Ventana-emergente - Popup)

Crim MC, Munro HN:

Proteins and amino acids. In Shils ME, Olson JA, Shike M, editors: Modern nutrition in health and disease, ed 8, Philadelphia, 1993, Lea & Febiger.

1491 (Ventana-emergente - Popup)

Kaplan LA, general editor:

Laboratory support in assessing and monitoring nutritional status, National Academy of Clinical Biochemistry's "Standards of Laboratory Practice" series, pp 12-13.

1492 (Ventana-emergente - Popup)

Linscheer WG, Vergroesen AJ:

Lipids. In Shils ME, Olson JA, Shike M, editors: Modern nutrition in health and disease, ed 8, Philadelphia, 1993, Lea & Febiger.

1493 (Ventana-emergente - Popup)

Nordin BEC, editor:

Calcium in human biology, London, 1988, Springer-Verlag.

Shils ME:

Magnesium. In Shils ME, Olson JA, Shike M, editors: Modern nutrition in health and disease, ed 8, Philadelphia, 1993, Lea & Febiger.

1494 (Ventana-emergente - Popup)

Schneeman BO, Tietzen J:

Dietary fiber. In Shils ME, Olson JA, Shike M, editors: Modern nutrition in health and disease, ed 8, Philadelphia, 1993, Lea & Febiger.

1495 (Ventana-emergente - Popup)

Schneeman BO, Tietzen J:

Dietary fiber. In Shils ME, Olson JA, Shike M, editors: Modern nutrition in health and disease, ed 8, Philadelphia, 1993, Lea & Febiger.

1496 (Ventana-emergente - Popup)

Report of National Cholesterol Education Program Expert Panel on Diet, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults, Arch Intern Med 48:36-69, 1988.

Anderson JW, Geil PB:

Diabetes, Am J Med 85(suppl 5A):1259-1286, 1988.

Roe DA:

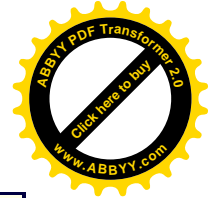
Diet, nutrition, and drug interactions. In Shils ME, Olson JA, Shike M, editors: Modern nutrition in health and disease, ed 8, Philadelphia, 1993, Lea & Febiger.

Shils ME:

Nutrition and diet in cancer management. In Shils ME, Olson JA, Shike M, editors: Modern nutrition in health and disease, ed 8, Philadelphia, 1993, Lea & Febiger.

1497 (Ventana-emergente - Popup)

Report of National Cholesterol Education Program Expert Panel on Diet, Evaluation



and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults, Arch Intern Med 48:36-69, 1988.

1498 (Ventana-emergente - Popup)

Anderson JW, Geil PB: Diabetes, Am J Med 85(suppl 5A): 1259-1286, 1988.

1499 (Ventana-emergente - Popup)

Roe DA:

Diet, nutrition, and drug interactions. In Shils ME, Olson JA, Shike M, editors: Modern nutrition in health and disease, ed 8, Philadelphia, 1993, Lea & Febiger.

1500 (Ventana-emergente - Popup)

Kaplan LA, general editor:

Laboratory support in assessing and monitoring nutritional status, National Academy of Clinical Biochemistry's "Standards of Laboratory Practice" series, pp 12-13.

1501 (Ventana-emergente - Popup)

Shils ME:

Nutrition and diet in cancer management. In Shils ME, Olson JA, Shike M, editors: Modern nutrition in health and disease, ed 8, Philadelphia, 1993, Lea & Febiger.

1502 (Ventana-emergente - Popup)

Shike M:

Enteral feeding. In Shils ME, Olson JA, Shike M, editors: Modern nutrition in health and disease, ed 8, Philadelphia, 1993, Lea & Febiger.

Shils ME:

Parenteral nutrition. In Shils ME, Olson JA, Shike M, editors: Modern nutrition in health and disease, ed 8, Philadelphia, 1993, Lea & Febiger.

1503 (Ventana-emergente - Popup)

Shike M:

Enteral feeding. In Shils ME, Olson JA, Shike M, editors: Modern nutrition in health and disease, ed 8, Philadelphia, 1993, Lea & Febiger.

1504 (Ventana-emergente - Popup)

Shike M:

Enteral feeding. In Shils ME, Olson JA, Shike M, editors: Modern nutrition in health and disease, ed 8, Philadelphia, 1993, Lea & Febiger.

1505 (Ventana-emergente - Popup)

Shils ME:

Parenteral nutrition. In Shils ME, Olson JA, Shike M, editors: Modern nutrition in health and disease, ed 8, Philadelphia, 1993, Lea & Febiger.

1506 (Ventana-emergente - Popup)

Shils ME:

Parenteral nutrition. In Shils ME, Olson JA, Shike M, editors: Modern nutrition in health and disease, ed 8, Philadelphia, 1993, Lea & Febiger.

1507 (Ventana-emergente - Popup)

Elsas LJ, Acosta PB:

Nutrition support of inherited metabolic disease. In Shils ME, Olson JA, Shike M, editors: Modern nutrition in health and disease, ed 8, Philadelphia, 1993, Lea & Febiger.



1508 (Ventana-emergente - Popup)

Elsas LJ, Acosta PB:

Nutrition support of inherited metabolic disease. In Shils ME, Olson JA, Shike M, editors: *Modern nutrition in health and disease*, ed 8, Philadelphia, 1993, Lea & Febiger.

1509 (Ventana-emergente - Popup)

Kaplan LA, general editor:

Laboratory support in assessing and monitoring nutritional status, National Academy of Clinical Biochemistry's "Standards of Laboratory Practice" series, pp 12-13.

1510 (Ventana-emergente - Popup)

Kaplan LA, general editor:

Laboratory support in assessing and monitoring nutritional status, National Academy of Clinical Biochemistry's "Standards of Laboratory Practice" series, pp 12-13.

Konstantinides FN, Konstantinides NN, Lin JC, et al:

Urine urea nitrogen: too insensitive for calculating nitrogen balance in clinical nutrition, *JPEN* 15:189-195, 1991.

1511 (Ventana-emergente - Popup)

Kaplan LA, general editor:

Laboratory support in assessing and monitoring nutritional status, National Academy of Clinical Biochemistry's "Standards of Laboratory Practice" series, pp 12-13.

1512 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Recommended Dietary Allowances, ed 10, Subcommittee on the Tenth Edition of the RDA's Food and Nutrition Board, Commission on Life Sciences, National Research Council, National Academy Press, Washington, D.C., 1989, p 284.

1513 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Anderson RA: Chromium. In Wertz W, editor:

Trace elements in human and animal nutrition, ed 5, New York, 1987, Academic Press, vol 1.

Anderson RA, Polansky MM, Bryden NA, et al:

Chromium supplementation of human subjects: effect on glucose, insulin, and lipid variables, *Metabolism* 32:894-899, 1983.

Okada S, Tsukada H, Ohba HJ:

Enhancement of nucleolar RNA synthesis by chromium (III) in regenerating rat liver, *J Inorg Biochem* 21:113, 1984.

Jeejeebhoy KN, Chu RC, Marliss EK, et al:

Chromium depletion: glucose intolerance and neuropathy reversed by chromium supplementation in a patient receiving long-term total parenteral nutrition, *Am J Clin Nutr* 30:531-538, 1977.

Fishbein L:

Perspectives of analysis of carcinogenic and mutagenic metals in biological samples, *Int J Environ Anal* 28:21-69, 1988.

Veillon C, Patterson KY, Bryden NA:

Determination of chromium in human serum by electrothermal atomic absorption spectrometry, *Anal Chim Acta* 164:67-76, 1984.

Veillon C, Patterson KY, Bryden NA:

Chromium in urine as measured by atomic absorption spectrometry, *Clin Chem* 28:2309-2311,



1982.

1514 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Anderson RA, Polansky MM, Bryden NA, et al:

Chromium supplementation of human subjects: effect on glucose, insulin, and lipid variables, *Metabolism* 32:894-899, 1983.

1515 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Okada S, Tsukada H, Ohba HJ:

Enhancement of nucleolar RNA synthesis by chromium (III) in regenerating rat liver, *J Inorg Biochem* 21:113, 1984.

1516 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Jeejeebhoy KN, Chu RC, Marliss EK, et al:

Chromium depletion: glucose intolerance and neuropathy reversed by chromium supplementation in a patient receiving long-term total parenteral nutrition, *Am J Clin Nutr* 30:531-538, 1977.

1517 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Anderson RA: Chromium. In Wertz W, editor:

Trace elements in human and animal nutrition, ed 5, New York, 1987, Academic Press, vol 1.

1518 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Fishbein L:

Perspectives of analysis of carcinogenic and mutagenic metals in biological samples, *Int J Environ Anal* 28:21-69, 1988.

1519 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Veillon C, Patterson KY, Bryden NA:

Determination of chromium in human serum by electrothermal atomic absorption spectrometry, *Anal Chim Acta* 164:67-76, 1984.

Veillon C, Patterson KY, Bryden NA:

Chromium in urine as measured by atomic absorption spectrometry, *Clin Chem* 28:2309-2311, 1982.

1520 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Veillon C, Patterson KY, Bryden NA:

Determination of chromium in human serum by electrothermal atomic absorption spectrometry, *Anal Chim Acta* 164:67-76, 1984.

Veillon C, Patterson KY, Bryden NA:

Chromium in urine as measured by atomic absorption spectrometry, *Clin Chem* 28:2309-2311, 1982.

1521 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Mason K:

A conspectus of research on copper metabolism and requirements of man, *J Nutr* 109:1979-2066, 1979.

O'Dell BI:



Copper. In Brown ML, editor: *Present knowledge in nutrition*, ed 6, Washington, D.C., 1990, International Life Sciences Institute, Nutrition Foundation.

Reiser S, Smith JC, Mertz W, et al:

Indices of copper status in humans consuming a typical American diet containing either fructose or starch, *Am J Clin Nutr* 42:242-251, 1985.

Klevay LM, Inman L, Johnson LK, et al:

Increased cholesterol in plasma in a young man during experimental copper depletion, *Metabolism* 33:1112-1118, 1984.

Danks DM, Campbell PE, Stevens BJ, et al:

Menkes' kinky hair syndrome: an inherited defect in copper absorption with widespread effects, *Pediatrics* 50:188-201, 1972.

Brewer GJ, Hill GM, Dick RD, et al:

Treatment of Wilson's disease with zinc. III: Prevention of reaccumulation of hepatic copper, *J Lab Clin Med* 109:526-531, 1987.

Milne DB, Johnson PE:

Assessment of copper status: effect of age and gender on reference ranges in healthy adults, *Clin Chem* 39:883-887, 1993.

Alcock NW:

Copper. In Pesce AJ, Kaplan LA, editors: *Methods in clinical chemistry*, St. Louis, 1987, Mosby.

1522 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Reiser S, Smith JC, Mertz W, et al:

Indices of copper status in humans consuming a typical American diet containing either fructose or starch, *Am J Clin Nutr* 42:242-251, 1985.

1523 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Klevay LM, Inman L, Johnson LK, et al:

Increased cholesterol in plasma in a young man during experimental copper depletion, *Metabolism* 33:1112-1118, 1984.

1524 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Danks DM, Campbell PE, Stevens BJ, et al:

Menkes' kinky hair syndrome: an inherited defect in copper absorption with widespread effects, *Pediatrics* 50:188-201, 1972.

1525 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Brewer GJ, Hill GM, Dick RD, et al:

Treatment of Wilson's disease with zinc. III: Prevention of reaccumulation of hepatic copper, *J Lab Clin Med* 109:526-531, 1987.

1526 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Milne DB, Johnson PE:

Assessment of copper status: effect of age and gender on reference ranges in healthy adults, *Clin Chem* 39:883-887, 1993.



1527 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Krishnamachari KAVR:

Fluorine. In Mertz W, editor: *Trace elements in human and animal nutrition*, ed 5, New York, 1987, Academic Press, vol 1.

Department of Health and Human Services, Public Health Service:

Review of fluoride benefits and risks, report of ad hoc subcommittee on fluoride of the committee to coordinate environmental health and related programs, Washington, D.C., 1991, US Government Printing Office.

Riggs BL, Seeman E, Hodgson SF, et al:

Effect of fluoride/calcium regimen on vertebral fracture occurrence in postmenopausal osteoporosis: comparison with conventional therapy, *N Engl J Med* 306:446-450, 1982.

Riggs BL, Hodgson SF, O'Fallon WM, et al:

Effect of fluoride treatment on the fracture rate in postmenopausal women with osteoporosis, *N Engl J Med* 322:802-809, 1994.

Blancke RV, Decker WJ:

Analysis of toxic substances: determination of fluoride in plasma and urine by ion specific potentiometry. In Tietz NW, editor: *Textbook of clinical chemistry*, New York, 1986, Saunders.

1528 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Krishnamachari KAVR:

Fluorine. In Mertz W, editor: *Trace elements in human and animal nutrition*, ed 5, New York, 1987, Academic Press, vol 1.

1529 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Department of Health and Human Services, Public Health Service:

Review of fluoride benefits and risks, report of ad hoc subcommittee on fluoride of the committee to coordinate environmental health and related programs, Washington, D.C., 1991, US Government Printing Office.

Riggs BL, Seeman E, Hodgson SF, et al:

Effect of fluoride/calcium regimen on vertebral fracture occurrence in postmenopausal osteoporosis: comparison with conventional therapy, *N Engl J Med* 306:446-450, 1982.

1530 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Blancke RV, Decker WJ:

Analysis of toxic substances: determination of fluoride in plasma and urine by ion specific potentiometry. In Tietz NW, editor: *Textbook of clinical chemistry*, New York, 1986, Saunders.

1531 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Blancke RV, Decker WJ:

Analysis of toxic substances: determination of fluoride in plasma and urine by ion specific potentiometry. In Tietz NW, editor: *Textbook of clinical chemistry*, New York, 1986, Saunders.

1532 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Hetzel BS, Maberly GF:

Iodine. In Mertz W, editor: *Trace elements in human and animal nutrition*, ed 5, New York, 1986, Academic Press, vol 2.

Clugston GA, Hetzel BS:

Iodine. In Shils ME, Olsen JA, Shike M, editors: *Modern nutrition in health and disease*, ed 8, Philadelphia, 1993, Lea & Febiger.



Larson PR, Alexander NM, Chopra IJ, et al:

Revised nomenclature for tests of thyroid hormones and thyroid related proteins in serum, *J Clin Endocrinol Metab* 64:1089-1094, 1987.

1533 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Hetzel BS, Maberly GF:

Iodine. In Mertz W, editor: *Trace elements in human and animal nutrition*, ed 5, New York, 1986, Academic Press, vol 2.

1534 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Larson PR, Alexander NM, Chopra IJ, et al:

Revised nomenclature for tests of thyroid hormones and thyroid related proteins in serum, *J Clin Endocrinol Metab* 64:1089-1094, 1987.

1535 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Clugston GA, Hetzel BS:

Iodine. In Shils ME, Olsen JA, Shike M, editors: *Modern nutrition in health and disease*, ed 8, Philadelphia, 1993, Lea & Febiger.

Larson PR, Alexander NM, Chopra IJ, et al:

Revised nomenclature for tests of thyroid hormones and thyroid related proteins in serum, *J Clin Endocrinol Metab* 64:1089-1094, 1987.

1536 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Keen CL, Zidenberg-Cherr S:

Manganese. In Brown ML, editor: *Newer knowledge in nutrition*, ed 6, Washington, D.C., 1990, International Life Sciences Institute, Nutrition Foundation.

Hurley LS, Keen CL:

Manganese. In Mertz W, editor: *Trace elements in human and animal nutrition*, ed 5, New York, 1987, Academic Press, vol 1.

Doisy EA Jr:

Effect of a deficiency in manganese upon plasma levels of clotting proteins in man. In Hoekstra WG, Suttie HE, Ganther HE, Mertz W, editors: *Trace elements in animals*, ed 2, Baltimore, 1974, University Park Press.

Cotzias GC, Miller ST, Papavasiliou PS, Tang LC:

Interactions between manganese and brain dopamine, *Med Clin North Am* 60:729-738, 1976. *Techniques for graphite furnace atomic absorption spectrophotometry*, Norwalk, Conn., 1985, Perkin-Elmer Corp, p 189.

1537 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Keen CL, Zidenberg-Cherr S:

Manganese. In Brown ML, editor: *Newer knowledge in nutrition*, ed 6, Washington, D.C., 1990, International Life Sciences Institute, Nutrition Foundation.

1538 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Doisy EA Jr:

Effect of a deficiency in manganese upon plasma levels of clotting proteins in man. In Hoekstra WG, Suttie HE, Ganther HE, Mertz W, editors: *Trace elements in animals*, ed 2, Baltimore, 1974, University Park Press.

1539 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)



Cotzias GC, Miller ST, Papavasilion PS, Tang LC:

Interactions between manganese and brain dopamine, *Med Clin North Am* 60:729-738, 1976.

1540 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Cotzias GC, Miller ST, Papavasilion PS, Tang LC:

Interactions between manganese and brain dopamine, *Med Clin North Am* 60:729-738, 1976.

1541 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Techniques for graphite furnace atomic absorption spectrophotometry, Norwalk, Conn., 1985, Perkin-Elmer Corp, p 189.

1542 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Nielsen FH:

Ultratrace minerals. In Shils ME, Olsen JA, Shike M, editors: *Modern nutrition in health and disease*, ed 8, Philadelphia, 1993, Lea & Febiger.

Mills CF, Davis GK:

Molybdenum. In Mertz W, editor: *Trace elements in humans and animals*, ed 5, New York, 1987, Academic Press, vol 1.

Abumrad NN, Schneider AJ, Steel D, Rogers LS:

Amino acid intolerance during prolonged TPN reversed by molybdate therapy, *Am J Clin Nutr* 34:2551-2559, 1981.

Koval'skii UV, Iarovaia, GA, Shmavonian DM:

[Modification of human and animal purine metabolism in conditions of various molybdenum bio-geochemical areas], *Zh Obshch Biol* 22:179-181, 1961.

International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC):

Determination of molybdenum in biological materials, *Pure Appl Chem* 63:1627-1630, 1991.

1543 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Mills CF, Davis GK:

Molybdenum. In Mertz W, editor: *Trace elements in humans and animals*, ed 5, New York, 1987, Academic Press, vol 1.

1544 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Abumrad NN, Schneider AJ, Steel D, Rogers LS:

Amino acid intolerance during prolonged TPN reversed by molybdate therapy, *Am J Clin Nutr* 34:2551-2559, 1981.

1545 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Koval'skii UV, Iarovaia, GA, Shmavonian DM:

[Modification of human and animal purine metabolism in conditions of various molybdenum bio-geochemical areas], *Zh Obshch Biol* 22:179-181, 1961.

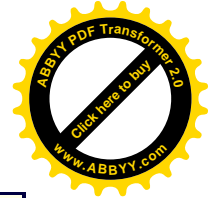
1546 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC):

Determination of molybdenum in biological materials, *Pure Appl Chem* 63:1627-1630, 1991.

1547 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Lockitch G:



Selenium: clinical significance and analytical concepts, *Crit Rev Clin Lab Sci* 27:483-541, 1989.

Lavender OA, Burke RF:

Selenium. In Shils ME, Olsen JA, Shike M, editors: *Modern nutrition in health and disease*, ed 8, Philadelphia, 1993, Lea & Febiger.

Robinson MF:

Selenium in human nutrition in New Zealand, *Nutr Rev* 47:99-107, 1989.

Ip C:

The chemopreventive role of selenium in carcinogenesis, *J Am Coll Toxicol* 5:7-20, 1986.

Ip C, Ganther HE:

Activity of methylated forms of selenium in cancer prevention, *Cancer Res* 50:1206-1211, 1990.

Ip C, Hayes C, Budnick RM, Ganther HE:

Chemical form of selenium, critical metabolites and cancer prevention, *Cancer Res* 51:595-600, 1991.

Lane HW, Lotspeich CA, Moore CA, et al:

The effect of selenium supplementation on selenium status of patients receiving chronic total parenteral nutrition, *JPEN* 11:117-120, 1987.

Keshan Disease Research Group:

Chin Med J 92:477-482, 1979.

McLaren CS:

Clinical manifestations of human vitamin and mineral disorders. In Shils ME, Olsen JA, Shike M, editors: *Modern nutrition in health and disease*, ed 8, Philadelphia, 1993, Lea & Febiger.

1548 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Lockitch G:

Selenium: clinical significance and analytical concepts, *Crit Rev Clin Lab Sci* 27:483-541, 1989.

1549 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Lockitch G:

Selenium: clinical significance and analytical concepts, *Crit Rev Clin Lab Sci* 27:483-541, 1989.

1550 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Robinson MF:

Selenium in human nutrition in New Zealand, *Nutr Rev* 47:99-107, 1989.

1551 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Lane HW, Lotspeich CA, Moore CA, et al:

The effect of selenium supplementation on selenium status of patients receiving chronic total parenteral nutrition, *JPEN* 11:117-120, 1987.

b

1552 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Ip C, Hayes C, Budnick RM, Ganther HE:

Chemical form of selenium, critical metabolites and cancer prevention, *Cancer Res* 51:595-600, 1991.

1553 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)



McLaren CS:

Clinical manifestations of human vitamin and mineral disorders. In Shils ME, Olsen JA, Shike M, editors: *Modern nutrition in health and disease*, ed 8, Philadelphia, 1993, Lea & Febiger.

1554 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Jacobson BE, Lockitch G:

Direct determination of selenium in serum by graphite furnace atomic absorption spectrometry with deuterium background correction and a reduced palladium modifier: age specific reference ranges, *Clin Chem* 34:709-714, 1988.

1555 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Keshan Disease Research Group:

Chin Med J 92:477-482, 1979.

1556 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Hambidge KM, Krebs NF:

Zinc. In Mertz W, editor: *Trace elements in humans and animals*, ed 5, New York, 1986, Academic Press, vol 2.

Cousins RJ, Hempe JM:

Zinc. In Brown ML, editor: *Present knowledge in nutrition*, ed 6, Washington, D.C., 1990, International Life Sciences Institute, Nutrition Foundation.

Prasad AS, Miale A Jr, Farid Z, et al:

Zinc metabolism in patients with the syndrome of iron deficiency anemia, hepatosplenomegaly, dwarfism, and hypogonadism, *J Lab Clin Med* 1:537-549, 1963.

Prasad AS:

Discovery and importance of zinc in human nutrition, *Fed Proc* 43:2829-2834, 1984.

Moynahan EJ, Barnes PM:

Zinc deficiency and a synthetic diet for lactose intolerance, *Lancet* 1:676-677, 1973.

Yokoi K, Alcock NW, Sandstead HH:

Iron and zinc nutriture of premenopausal women: associations of diet with serum ferritin and plasma zinc disappearance and of serum ferritin with plasma zinc and plasma zinc disappearance, *J Lab Clin Med* 124: 852-861, 1994.

Sandstead HH:

Zinc deficiency: a public health problem, *Am J Dis Child* 145:853-859, 1991.

Smith JC Jr, Butrimovitz GP, Purdy WC:

Direct measurement of zinc in plasma by atomic absorption spectroscopy, *Clin Chem* 25:1487-1491, 1979.

1557 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Prasad AS, Miale A Jr, Farid Z, et al:

Zinc metabolism in patients with the syndrome of iron deficiency anemia, hepatosplenomegaly, dwarfism, and hypogonadism, *J Lab Clin Med* 1:537-549, 1963.

Prasad AS:

Discovery and importance of zinc in human nutrition, *Fed Proc* 43:2829-2834, 1984.

1558 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Moynahan EJ, Barnes PM:

Zinc deficiency and a synthetic diet for lactose intolerance, *Lancet* 1:676-677, 1973.



1559 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Yokoi K, Alcock NW, Sandstead HH:

Iron and zinc nutriture of premenopausal women: associations of diet with serum ferritin and plasma zinc disappearance and of serum ferritin with plasma zinc and plasma zinc disappearance, *J Lab Clin Med* 124: 852-861, 1994.

1560 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Sandstead HH:

Zinc deficiency: a public health problem, *Am J Dis Child* 145:853-859, 1991.

1561 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Smith JC Jr, Butrimovitz GP, Purdy WC:

Direct measurement of zinc in plasma by atomic absorption spectroscopy, *Clin Chem* 25:1487-1491, 1979.

1562 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Alfrey AC:

Aluminum. In Mertz W, editor: *Trace elements in human and animal nutrition*, ed 5, New York, 1986, Academic Press, vol 2.

Ott SM, Malong NA, Klein GL, et al:

Aluminum is associated with low bone formation in patients receiving chronic parenteral nutrition, *Ann Intern Med* 98:910-914, 1983.

Sedman AB, Klein GL, Merritt RJ, et al:

Evidence of aluminum loading in infants receiving intravenous therapy, *N Engl J Med* 312:1337-1343, 1985.

Klein GL, Alfrey AC, Miller AL, et al:

Aluminum loading during total parenteral nutrition, *Am J Clin Nutr* 35:1425-1429, 1982.

Koo WWK, Kaplan LA, Horn J, et al:

Aluminum in parenteral nutrition solutions-sources and possible alternatives, *JPEN* 10:591-595, 1986.

Klein GL, Alfrey AC, Shike M, et al:

Parent drug products containing aluminum as an ingredient or a contaminant: response to FDA notice of intent, *Am J Clin Nutr* 53:399-402, 1991.

Alcock NW, Goeger MP:

Determination of aluminum with Zeeman graphite furnace atomic absorption spectrophotometry. (In press.)

1563 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Alfrey AC:

Aluminum. In Mertz W, editor: *Trace elements in human and animal nutrition*, ed 5, New York, 1986, Academic Press, vol 2.

Ott SM, Malong NA, Klein GL, et al:

Aluminum is associated with low bone formation in patients receiving chronic parenteral nutrition, *Ann Intern Med* 98:910-914, 1983.

Sedman AB, Klein GL, Merritt RJ, et al:

Evidence of aluminum loading in infants receiving intravenous therapy, *N Engl J Med* 312:1337-1343, 1985.

Klein GL, Alfrey AC, Miller AL, et al:



Aluminum loading during total parenteral nutrition, *Am J Clin Nutr* 35:1425-1429, 1982.

1564 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Koo WWK, Kaplan LA, Horn J, et al:

Aluminum in parenteral nutrition solutions-sources and possible alternatives, *JPEN* 10:591-595, 1986.

1565 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Alfrey AC:

Aluminum. In Mertz W, editor: *Trace elements in human and animal nutrition*, ed 5, New York, 1986, Academic Press, vol 2.

Ott SM, Malong NA, Klein GL, et al:

Aluminum is associated with low bone formation in patients receiving chronic parenteral nutrition, *Ann Intern Med* 98:910-914, 1983.

1566 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Alfrey AC:

Aluminum. In Mertz W, editor: *Trace elements in human and animal nutrition*, ed 5, New York, 1986, Academic Press, vol 2.

1567 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Anke M:

Arsenic. In Mertz W, editor: *Trace elements in human and animal nutrition*, ed 5, New York, 1986, Academic Press, vol 2.

Smith HS:

J Forensic Sci Soc 7:97-102, 1967.

Diplock AT, Mehlert A:

Arsenic. In Anke M, Schneider HJ, Bruckner C, editors: *Spurenelement-Symposium*, Geneva, 1980, Wiss Publisher, Friedrich- Schiller University, pp 75-81.

Tan GKH, Charbonneau SM, Bryce F, Sandi E:

Excretion of a single oral dose of fish-arsenic in man, *Bull Envir Contam Toxicol* 28:669-673, 1982.

Peterson RG, Rumack BH:

d-Penicillamine therapy of acute arsenic poisoning, *J Pediatr* 91:661-666, 1977.

Tadlock CH, Aposhian V:

Protection of mice against lethal effects of sodium arsenite by 2,3-dimercapto-1-propane sulfonic acid and dimercaptosuccinic acid, *Biochem Biophys Res Comm* 94:501-507, 1980.

Levine WG, Goodman LS, Gilman A, editors:

Heavy metals and heavy metal antagonists. In *Pharmacological basis of therapeutics*, ed 5, New York, 1975, MacMillan.

1568 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Anke M:

Arsenic. In Mertz W, editor: *Trace elements in human and animal nutrition*, ed 5, New York, 1986, Academic Press, vol 2.

1569 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Diplock AT, Mehlert A:

Arsenic. In Anke M, Schneider HJ, Bruckner C, editors: *Spurenelement-Symposium*, Geneva, 1980,



Wiss Publisher, Friedrich- Schiller University, pp 75-81.

1570 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Smith HS:

J Forensic Sci Soc 7:97-102, 1967.

1571 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Diplock AT, Mehler A:

Arsenic. In Anke M, Schneider HJ, Bruckner C, editors: *Spurenelement-Symposium*, Geneva, 1980, Wiss Publisher, Friedrich- Schiller University, pp 75-81.

1572 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Tan GKH, Charbonneau SM, Bryce F, Sandi E:

Excretion of a single oral dose of fish-arsenic in man, *Bull Envir Contam Toxicol* 28:669-673, 1982.

1573 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Peterson RG, Rumack BH:

d-Penicillamine therapy of acute arsenic poisoning, *J Pediatr* 91:661-666, 1977.

Tadlock CH, Aposhian V:

Protection of mice against lethal effects of sodium arsenite by 2,3-dimercapto-1-propane sulfonic acid and dimercaptosuccinic acid, *Biochem Biophys Res Comm* 94:501-507, 1980.

Levine WG, Goodman LS, Gilman A, editors:

Heavy metals and heavy metal antagonists. In *Pharmacological basis of therapeutics*, ed 5, New York, 1975, MacMillan.

1574 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Kostial K: Cadmium. In Mertz W, editor:

Trace elements in human and animal nutrition, ed 5, New York, 1986, Academic Press, vol 2.

Kjellstrom T:

Exposure and accumulation of cadmium in populations from Japan, the United States, and Sweden, *Environ Health Perspect* 28:169-176, 1979.

Smith TJ, Temple AR, Reading JC, et al:

Cadmium, lead, and copper blood levels in normal children, *Clin Toxicol* 9:75-87, 1976.

Kowal DE, Johnson DE, Kraemer DF, Pahren HR:

Normal levels of cadmium in diet, urine, blood, and tissues of inhabitants of the United States, *J Toxicol Environ Health* 5:995-1014, 1979.

Nordberg M:

Studies on metallothionein and cadmium, *Environ Res* 15:381-404, 1978.

Tohyama C, Shaikh ZA, Nogawa K, et al:

Urinary metallothionein as a new index of renal dysfunction in "itai-itai" disease patients and other Japanese women environmentally exposed to cadmium, *Arch Toxicol* 50:159-166, 1982.

Klassen CD, Waalkes MP, Cantilena LR:

Alteration of tissue disposition of cadmium by chelating agents, *Environ Health Perspect* 54:233-242, 1984.

1575 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Kjellstrom T:

Exposure and accumulation of cadmium in populations from Japan, the United States, and Sweden, *Environ Health Perspect* 28:169-176, 1979.

1576 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)



Smith TJ, Temple AR, Reading JC, et al:

Cadmium, lead, and copper blood levels in normal children, *Clin Toxicol* 9:75-87, 1976.

Kowal DE, Johnson DE, Kraemer DF, Pahren HR:

Normal levels of cadmium in diet, urine, blood, and tissues of inhabitants of the United States, *J Toxicol Environ Health* 5:995-1014, 1979.

1577 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Nordberg M:

Studies on metallothionein and cadmium, *Environ Res* 15:381-404, 1978.

1578 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Tohyama C, Shaikh ZA, Nogawa K, et al:

Urinary metallothionein as a new index of renal dysfunction in "itai-itai" disease patients and other Japanese women environmentally exposed to cadmium, *Arch Toxicol* 50:159-166, 1982.

1579 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Klassen CD, Waalkes MP, Cantilena LR:

Alteration of tissue disposition of cadmium by chelating agents, *Environ Health Perspect* 54:233-242, 1984.

1580 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Centers for Disease Control and Prevention (CDC):

Preventing lead poisoning in young children-a statement by the CDC, Atlanta, 1991, Department of Health and Human Services, Public Health Service.

Quarterman KA:

Lead. In Mertz W, editor: *Trace elements in human and animal nutrition*, ed 5, New York, 1986, Academic Press, vol 2.

Piomelli S, Graziano J:

Laboratory diagnosis of lead poisoning, *Pediatr Clin North Am* 27:843-853, 1980.

Mahaffey KR:

Environmental lead toxicity: nutrition as a component of intervention, *Environ Health Perspect* 89:75-78, 1990.

Bellinger DC, Stiles KM, Needleman HL:

Low level lead exposure, intelligence, and academic achievement: a long-term follow up study, *Pediatrics* 90:855-861, 1992.

Needleman HL:

The current status of low level lead toxicity, *Neurotoxicology* 14:161-166, 1993.

Jorgensen FM:

Succimer: the first approved oral lead chelator, *Am Fam Physician* 48:1496-1502, 1993.

Jacobsen BE, Lockich G, Quigley G:

Improved sample preparation for accurate determination of low concentrations of lead in whole blood by graphite furnace analysis, *Clin Chem* 37:515-519, 1991.

1581 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Centers for Disease Control and Prevention (CDC):

Preventing lead poisoning in young children-a statement by the CDC, Atlanta, 1991, Department of Health and Human Services, Public Health Service.

1582 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Centers for Disease Control and Prevention (CDC):



Preventing lead poisoning in young children-a statement by the CDC, Atlanta, 1991, Department of Health and Human Services, Public Health Service.

1583 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Quarterman KA:

Lead. In Mertz W, editor: *Trace elements in human and animal nutrition*, ed 5, New York, 1986, Academic Press, vol 2.

Piomelli S, Graziano J:

Laboratory diagnosis of lead poisoning, *Pediatr Clin North Am* 27:843-853, 1980.

Needleman HL:

The current status of low level lead toxicity, *Neurotoxicology* 14:161-166, 1993.

1584 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Mahaffey KR:

Environmental lead toxicity: nutrition as a component of intervention, *Environ Health Perspect* 89:75-78, 1990.

1585 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Bellinger DC, Stiles KM, Needleman HL:

Low level lead exposure, intelligence, and academic achievement: a long-term follow up study, *Pediatrics* 90:855-861, 1992.

Needleman HL:

The current status of low level lead toxicity, *Neurotoxicology* 14:161-166, 1993.

1586 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Jorgensen FM:

Succimer: the first approved oral lead chelator, *Am Fam Physician* 48:1496-1502, 1993.

1587 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Jorgensen FM:

Succimer: the first approved oral lead chelator, *Am Fam Physician* 48:1496-1502, 1993.

1588 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Clarkson TW:

Mercury. In Mertz W, editor: *Trace elements in human and animal nutrition*, ed 5, New York, 1987, Academic Press, vol 1.

Subaki T, Irukagama K:

Minamata disease: methyl mercury poisoning in Minamata and Niigata, Japan, Amsterdam, 1977, Elsevier Scientific Publishing Co.

Choi BH:

The effects of methyl mercury on the developing brain, *Prog Neurobiol* 32:447-470, 1989.

Swedish Expert Group:

MeHg in fish: a toxicologic-epidemiologic level of risks report from an expert, *Nord Hyg Tidsk* (supp 4), pp 1-364, 1971.

Magos L, Clarkson TW:

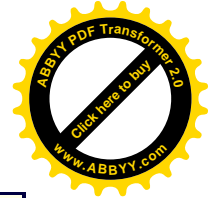
Atomic absorption determination total, inorganic and organic mercury in blood, *J Assoc Office Anal Chem* 55:966-971, 1972.

1589 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Subaki T, Irukagama K:

Minamata disease: methyl mercury poisoning in Minamata and Niigata, Japan, Amsterdam, 1977, Elsevier Scientific Publishing Co.

1590 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)



Choi BH:

The effects of methyl mercury on the developing brain, *Prog Neurobiol* 32:447-470, 1989.

1591 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Choi BH:

The effects of methyl mercury on the developing brain, *Prog Neurobiol* 32:447-470, 1989.

1592 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Subaki T, Irukagama K:

Minamata disease: methyl mercury poisoning in Minamata and Niigata, Japan, Amsterdam, 1977, Elsevier Scientific Publishing Co.

1593 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Magos L, Clarkson TW:

Atomic absorption determination total, inorganic and organic mercury in blood, *J Assoc Office Anal Chem* 55:966-971, 1972.

1594 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Swedish Expert Group:

MeHg in fish: a toxicologic-epidemiologic level of risks report from an expert, *Nord Hyg Tidsk* (supp 4), pp 1-364, 1971.

1595 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Food and Nutrition Board:

Recommended Dietary Allowances, ed 10, Washington, D.C., 1989, National Academy of Science.

1596 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Snodgrass GR:

Vitamin neurotoxicity, *Molec Neurobiol* 6:41-73, 1992.

Garry PJ:

Vitamin A. In Labbe RF, editor: *Clinics in laboratory medicine, vol 1, Laboratory assessment of nutritional status*, Philadelphia, 1981, Saunders.

1597 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Underwood BA:

Methods for assessment of vitamin A status, *J Nutr* 120(suppl 11):1459-1463, 1990.

1598 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Perera FP, Tang D, Grinberg-Funes RA, et al: Molecular epidemiology of lung cancer and the modulation of markers of chronic carcinogen exposure by chemopreventive agents, *J Cell Biochem*, suppl 17F:119-128, 1993.

1599 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Shamberger RJ:

Vitamin A alterations in disease. In Brewster MA, Naito HK, editors: *Nutritional elements and clinical biochemistry*, New York, 1980, Plenum Publishing, pp 117-130.

Sklan D:

Vitamin A in human nutrition, *Prog Food Nutr Sci* 11:39-55, 1987.

1600 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Sokol RJ:

Vitamin E and neurological deficits, *Adv Pediatr* 37:119-148, 1990.

1601 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Sokol RJ:

Vitamin E and neurological deficits, *Adv Pediatr* 37:119-148, 1990.

1602 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Bland J:



Lipid antioxidant nutrition. In Brewster MA, Naito HK, editors: *Nutritional elements and clinical biochemistry*, New York, 1980, Plenum Publishing.

1603 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Sokol RJ:

Vitamin E and neurological deficits, *Adv Pediatr* 37:119-148, 1990.

1604 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Manson JE, Gaziano JM, Jonas MA, Hennekens CH:

Antioxidants and cardiovascular disease: a review, *J Am Coll Nutr* 12:426-432, 1993.

1605 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Sokol RJ, Guggenheim MA, Henbi JE, et al:

Frequency and clinical progression of the vitamin E deficiency neurologic disorder in children with prolonged neonatal cholestasis, *Am J Dis Child* 139:1211-1215, 1985.

1606 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Sokol RJ:

Vitamin E and neurological deficits, *Adv Pediatr* 37:119-148, 1990.

1607 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Pereira GR, Zucker A:

Nutritional deficiencies in the neonate, *Clin Perinatol* 13:175-189, 1986.

Garry PJ:

Vitamin A. In Labbe RF, editor: *Clinics in laboratory medicine, vol 1, Laboratory assessment of nutritional status*, Philadelphia, 1981, Saunders.

1608 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Farrell PM, Bieri JG:

Megavitamin E supplementation in man, *Am J Clin Nutr* 28:1381, 1975.

Bieri JG, Evarts RP, Thorp S:

Factors affecting the exchange of tocopherol between red cells and plasma, *Am J Clin Nutr* 30:686, 1977.

1609 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Briggs MH, editor:

Vitamins in human biology and medicine, Boca Raton, Fla., 1981, CRC Press.

Ogumekan AO:

Vitamin E deficiency and seizures in animals and man, *Can J Neurol Sci* 6:43-45, 1979.

1610 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Hazell K, Baloch KH:

Vitamin K deficiency in the elderly, *Gerontol Clin* 12:10-17, 1970.

1611 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Motohara K, Endo F, Matsuda I:

Screening for late neonatal vitamin K deficiency by acarboxyprothrombin in dried blood spots, *Arch Dis Child* 62:370-375, 1987.

1612 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Holick MF:

The use and interpretation of assays for vitamin D and its metabolites, *J Nutr* 120(suppl 11):1464-1469, 1990.

1613 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Taylor CB, Peng S:

Vitamin D\ Mits excessive use in the U.S.A. In Brewster MA, Naito HK, editors: *Nutritional elements and clinical biochemistry*, New York, 1980, Plenum Publishing.

1614 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Sauberlich HE:

Ascorbic acid. In Labbe RF, editor: *Clinics in laboratory medicine, vol 1, Laboratory assessment of nutritional status*, Philadelphia, 1981, Saunders.



Englard S, Seifter S:

The biochemical functions of ascorbic acid, *Annu Rev Nutr* 6:265-304, 1986.

1615 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Jacob RA:

Assessment of human vitamin C status, *J Nutr* 120 (suppl 11):1480-1485, 1990.

Washko PW, Welch RW, Dhariwal KR, et al:

Ascorbic acid and dehydroascorbic acid analyses in biological samples, *Anal Biochem* 204:1-14, 1992.

1616 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Jacob RA:

Assessment of human vitamin C status, *J Nutr* 120 (suppl 11):1480-1485, 1990.

Washko PW, Welch RW, Dhariwal KR, et al:

Ascorbic acid and dehydroascorbic acid analyses in biological samples, *Anal Biochem* 204:1-14, 1992.

1617 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Mirvish SS:

Effects of vitamins C and E on N-nitroso compound formation, carcinogenesis and cancer, *Cancer* 58:1842-1850, 1986.

1618 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Komindr S, Michaels GE:

Clinical significance of riboflavin deficiency. In Brewster MA, Naito HK, editors: *Nutritional elements and clinical biochemistry*, New York, 1980, Plenum Publishing.

1619 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Bates CJ:

Human riboflavin requirements and metabolic consequences of deficiency in men and animals, *World Rev Nutr Diet* 50:215-266, 1987.

1620 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Pinto J, Raiczuk GB, Huang YP, Rivlin RS:

New approaches to the possible prevention of side effects of chemotherapy by nutrition, *Cancer* 58:1911-1924, 1986.

1621 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Leklem JE:

Vitamin B₆: a status report, *J Nutr* 120(suppl 11):1503-1507, 1990.

1622 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Vermaak WJ, Bernard HC, Potgieter GM, Theran HD:

Vitamin B₆ and coronary artery disease: epidemiological observations and case studies, *Atherosclerosis* 63:235-238, 1987.

1623 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Leklem JE:

Vitamin B₆: a status report, *J Nutr* 120(suppl 11):1503-1507, 1990.

1624 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Wahlqvist ML:

Effects on plasma cholesterol of nicotinic acid and its analogues. In Briggs MH, editor: *Vitamins in human biology and medicine*, Boca Raton, Fla., 1981, CRC Press.

1625 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Glueck CJ:

Nonpharmacologic and pharmacologic alteration of high-density lipoprotein cholesterol: therapeutic approaches to prevention of atherosclerosis, *Am Heart J* 110:1107-1115, 1985.

1626 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Gentile S, Orzes N, Persico M, et al:

Comparison of nicotinic acid- and caloric restriction-induced hyperbilirubinaemia in the diagnosis of Gilbert's



syndrome, *J Hepatol* 1:537-543, 1985.

1627 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Flint DM, Prinsley DM:

Vitamin status of the elderly. In Briggs MH, editor: *Vitamins in human biology and medicine*, Boca Raton, Fla., 1981, CRC Press.

1628 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Blass JP:

Thiamin and the Wernicke-Korsakoff syndrome. In Briggs MH, editor: *Vitamins in human biology and medicine*, Boca Raton, Fla., 1981, CRC Press.

1629 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Poloni M, Mazzarello P, Patrini C, and Pinelli P:

Inversion of T/TMP ratio in ALS: a specific finding? *Ital J Neurol Sci* 7:333-335, 1986.

1630 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Roth KS, Allen L, Yang W, et al:

Serum and urinary biotin levels during treatment of holocarboxylase synthetase deficiency, *Clin Chim Acta* 109:337, 1981.

1631 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Wolf B, Heard GS, Weissbecker KA, et al:

Biotinidase deficiency: initial clinical features and rapid diagnosis, *Ann Neurol* 18:614-617, 1985.

1632 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Farrell PM, Bieri JG:

Megavitamin E supplementation in man, *Am J Clin Nutr* 28:1381, 1975.

Blass JP:

Thiamin and the Wernicke-Korsakoff syndrome. In Briggs MH, editor: *Vitamins in human biology and medicine*, Boca Raton, Fla., 1981, CRC Press.

1633 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Schwabedal PE, Pietrzik K, Wittkowski W:

Pantothenic acid deficiency as a factor contributing to the development of hypertension, *Cardiology* 71(suppl 1):187-189, 1985.

1634 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Ueland PM, Refsum H, Stabler SP, et al:

Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications, *Clin Chem* 39:1764-1779, 1993.

1635 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Ueland PM, Refsum H, Stabler SP, et al:

Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications, *Clin Chem* 39:1764-1779, 1993.

1636 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Ueland PM, Refsum H, Stabler SP, et al:

Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications, *Clin Chem* 39:1764-1779, 1993.

1637 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Infante-Rivard C, Krieger M, Bascon-Barre M, Rivard SE:

Folate deficiency among institutionalized elderly: public health impact, *J Am Geriatr Soc* 34:211-214, 1986.

1638 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Bailey LB:

Folate status assessment, *J Nutr* 120(suppl 11):1508-1511, 1990.

1639 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Roe CR, Millington DS, Kahler SG, et al:

Carnitine homeostasis in the organic acidurias, *Prog Clin Biol Res* 321:383-402, 1990.

1640 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Tanphaichitr V, Leelahagul P:



Carnitine metabolism and human carnitine deficiency, *Nutrition* 9:246-254, 1993.

1641 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Roe CR, Millington DS, Kahler SG, et al:

Carnitine homeostasis in the organic acidurias, *Prog Clin Biol Res* 321:383-402, 1990.

Bendich A:

Physiological role of antioxidants in the immune system, *J Dairy Sci* 76:2789-2794, 1993.

Cheeseman KH, Slater TF:

An introduction to free radical biochemistry, *Br Med Bull* 49:481-493, 1993.

Perera FP, Tang D, Grinberg-Funes RA, et al:

Molecular epidemiology of lung cancer and the modulation of markers of chronic carcinogen exposure by chemopreventive agents, *J Cell Biochem*, suppl 17F:119-128, 1993.

Manson JE, Gaziano JM, Jonas MA, Hennekens CH:

Antioxidants and cardiovascular disease: a review, *J Am Coll Nutr* 12:426-432, 1993.

Taylor A:

Cataract: relationship between nutrition and oxidation, *J Am Coll Nutr* 12:138-146, 1993.

1642 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Farmer CJ, Abt AF:

Determination of reduced ascorbic acid in small amounts of blood, *Proc Soc Exp Biol Med* 34:146-150, 1936.

1643 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Washko PW, Welch RW, Dhariwal KR, et al:

Ascorbic acid and dehydroascorbic acid analyses in biological samples, *Anal Biochem* 204:1-14, 1992.

1644 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Zannoni V, Lynch M, Goldstein S, Sato P:

A rapid micromethod for the determination of ascorbic acid in plasma and tissues, *Biochem Med* 11:41-48, 1974.

1645 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Washko PW, Welch RW, Dhariwal KR, et al:

Ascorbic acid and dehydroascorbic acid analyses in biological samples, *Anal Biochem* 204:1-14, 1992.

1646 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Washko PW, Welch RW, Dhariwal KR, et al:

Ascorbic acid and dehydroascorbic acid analyses in biological samples, *Anal Biochem* 204:1-14, 1992.

1647 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Omaye ST, Turnbull JD, Sauberlich HE:

In: McCormick DB, Wright LD, editors: *Methods in enzymology*, New York, 1979, Academic Press, vol 62, pp 3-11.

1648 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Liu TZ, Chin N, Kiser MD, Bigler WN:

Specific spectrophotometry of ascorbic acid in serum or plasma by use of ascorbate oxidase, *Clin Chem* 28:2225-2228, 1982.

1649 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Washko PW, Welch RW, Dhariwal KR, et al:

Ascorbic acid and dehydroascorbic acid analyses in biological samples, *Anal Biochem* 204:1-14, 1992.

1650 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Garry PJ, Owen GM, Lashley DW, Ford PC:

Automated analysis of plasma and whole blood ascorbic acid, *Clin Biochem* 7:131-145, 1974.

1651 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

O'Broin S, Kelleher B:

Microbiological assay on microtitre plates of folate in serum and red cells, *J Clin Pathol* 45(4):344-347, 1992.

1652 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)



Chitis J:

The folate binding in milk, *Am J Clin Nutr* 20:1-4, 1967.

1653 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Givas JK, Gutcho S:

pH dependence of the binding of folates to milk binder in radioassay of folates, *Clin Chem* 21:427-428, 1975.

1654 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Hoffbrand AV, Newcombe BFA, Mollin DL: Method of assay of red cell folate activity and the value of the assay as a test for folate deficiency, *J Clin Pathol* 19:17-28, 1966.

1655 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Hoffbrand AV, Newcombe BFA, Mollin DL: Method of assay of red cell folate activity and the value of the assay as a test for folate deficiency, *J Clin Pathol* 19:17-28, 1966.

1656 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Hoffbrand AV, Newcombe BFA, Mollin DL:

Method of assay of red cell folate activity and the value of the assay as a test for folate deficiency, *J Clin Pathol* 19:17-28, 1966.

1657 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Scott JM, Weir DG:

Folate composition, synthesis and function in materials, *Clin Haematol* 5:547-568, 1976.

1658 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Lee DSC, Griffiths BW:

Human serum vitamin B₁₂ assay methods: a review, *Clin Biochem* 18:261-264, 1985.

1659 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Ross GIM:

Vitamin B₁₂ assay in body fluids using *Euglena gracilis*, *J Clin Pathol* 5:250-256, 1952.

1660 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Shorb MS:

Activity of vitamin B₁₂ for the growth of *Lactobacillus lactis*, *Science* 107:397-398, 1948.

1661 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Hunter SH, Provasoli L, Stokstad ELR, et al:

Assay of anti-pernicious anemia factor with *Euglena*, *Proc Soc Exp Biol Med* 70:118-120, 1949.

1662 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Hunter SH, Provasoli L, Filfus J:

Nutrition of some phagotropic fresh-water chrysomonads, *Ann NY Acad Sci* 56:852-862, 1953.

1663 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Allen RH:

More on no-boil assay, *The Ligand Quarterly* 5:48-49, 1982.

1664 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Kuemmerle SC, Boltinghous GL, Delby SM, et al:

Automated assay of vitamin B₁₂ by the Abbott IMX Analyzer, *Clin Chem* 38(10):2073-2077, 1992.

1665 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

van der Weide J, Homan HC, Cozijnsen-van Rheenen E, et al:

Nonisotopic binding assay for measuring vitamin B₁₂ and folate in serum, *Clin Chem* 38(5):766-768, 1992.

1666 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Mastropaolo W, Wilson MA:

Effect of light on serum B₁₂ and folate stability, *Clin Chem* 39(5):913, 1993.

1667 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Chen I-W, Silberstein EB, Maxon HR, et al:

Clinical significance of serum vitamin B₁₂ measured by radioassay using pure intrinsic factor, *J Nucl Med*



22:447-451, 1981.

1668 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Reynoso G, Fontelo P, Konopka S, et al:

Ligand assay methods for serum cobalamin, *The Ligand Quarterly* 3:34-40, 1980.

1669 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Chen I-W, Silberstein EB, Heninger LA, et al:

Comparison of the serum vitamin B12 (B12), Unsaturated B12 binding capacity (UBBC), and folate levels in white and black subjects, *Clin Chem* 32:1186, 1986.

1670 (Ventana-emergente - Popup)

Labbe RF, editor:

Clinics in laboratory medicine, vol 1, Laboratory assessment of nutritional status, Philadelphia, 1981, Saunders.

Briggs MH, editor:

Vitamins in human biology and medicine, Boca Raton, Fla., 1981, CRC Press.

Roth KS, Allen L, Yang W, et al:

Serum and urinary biotin levels during treatment of holocarboxylase synthetase deficiency, *Clin Chim Acta* 109:337, 1981.

1671 (Ventana-emergente - Popup)

Abramovich DR:

The volume of amniotic fluid and its regulating factors. In Fairweather DVI, Eskes TKAB, editors: Amniotic fluid: research and clinical application, ed 2, Amsterdam, 1978, Excerpta Medica.

1672 (Ventana-emergente - Popup)

Duenhoelter JH, Pritchard JA:

Fetal respiration: quantitative measurements of amniotic fluid inspired near-term by human and rhesus fetuses, *Am J Obstet Gynecol* 125:306-309, 1976.

1673 (Ventana-emergente - Popup)

Seeds AE:

Current concepts of amniotic fluid dynamics, *Am J Obstet Gynecol* 138:575-586, 1980.

1674 (Ventana-emergente - Popup)

Sandler M, editor:

Amniotic fluid and its clinical significance, New York, 1981, Marcel Dekker.

Fairweather DVI, Eskes TKAB, editors:

Amniotic fluid: research and clinical applications, Amsterdam, 1978, Excerpta Medica.

1675 (Ventana-emergente - Popup)

Hytten FE:

Water transfer. In Chamberlain GVP, Wilkinson AW, editors: Placental transfer, Tunbridge Wells, 1979, Pitman Medica.

1676 (Ventana-emergente - Popup)

Weaver TE:

Pulmonary surfactant-associated proteins, *Gen Pharmacol* 18:1-8, 1987.

1677 (Ventana-emergente - Popup)

Sandler M, editor:

Amniotic fluid and its clinical significance, New York, 1981, Marcel Dekker.



Fairweather DVI, Eskes TKAB, editors:

Amniotic fluid: research and clinical applications, Amsterdam, 1978, Excerpta Medica.

1678 (Ventana-emergente - Popup)

Sandler M, editor:

Amniotic fluid and its clinical significance, New York, 1981, Marcel Dekker.

Fairweather DVI, Eskes TKAB, editors:

Amniotic fluid: research and clinical applications, Amsterdam, 1978, Excerpta Medica.

1679 (Ventana-emergente - Popup)

Pierce JG, Parsons TF: Glycoprotein hormones: structure and function, Annu Rev Biochem 50:465-495, 1980.

1680 (Ventana-emergente - Popup)

Eberlein WR:

The fetal adrenal cortex. In Christy NP, editor: The human adrenal cortex, New York, 1971, Harper & Row.

1681 (Ventana-emergente - Popup)

France JT, Seddon RJ, Liggins GC:

A study of a pregnancy with low estrogen production due to placental sulfatase deficiency, J Clin Endocrinol Metab 36:1-9, 1973.

1682 (Ventana-emergente - Popup)

Schindler AE, Siiteri PK:

Isolation and quantitation of steroids from normal human amniotic fluids, J Clin Endocrinol Metab 28:1189-1198, 1968.

1683 (Ventana-emergente - Popup)

Kundu N, Carmody PJ, Didolkar SM, Petersen LP: Sequential determination of serum human placental lactogen, estriol, and esterol for assessment of fetal morbidity, Obstet Gynecol 52:513-520, 1978.

1684 (Ventana-emergente - Popup)

Notation AD, Tagatz GE: Unconjugated estriol and 15 α -hydroxyestriol in complicated pregnancies, Am J Obstet Gynecol 128:747-756, 1977.

1685 (Ventana-emergente - Popup)

Glinioer D, de Nayer P, Bourdoux P, et al.: Regulation of maternal thyroid during pregnancy, J Clin Endocrinol Metab 71:276-287, 1990.

1686 (Ventana-emergente - Popup)

Glinioer D, de Nayer P, Bourdoux P, et al.: Regulation of maternal thyroid during pregnancy, J Clin Endocrinol Metab 71:276-287, 1990.

Lowe TW, Cunningham FG:

Pregnancy and thyroid disease, Clin Obstet Gynecol 34:72-80, 1991.

1687 (Ventana-emergente - Popup)

Glinioer D, de Nayer P, Bourdoux P, et al.: Regulation of maternal thyroid during pregnancy, J Clin Endocrinol Metab 71:276-287, 1990.

Kennedy RL, Darne J, Griffiths H, et al: Thyroid-stimulatory effects of human chorionic gonadotropin in early pregnancy, Horm Res 33:177-183, 1990.

1688 (Ventana-emergente - Popup)



Glinoe D, de Nayer P, Bourdoux P, et al.: Regulation of maternal thyroid during pregnancy, *J Clin Endocrinol Metab* 71:276-287, 1990.

1689 (Ventana-emergente - Popup)

Desai RK, Norman RJ, Jialal I, et al: Spectrum of thyroid function abnormalities in gestational trophoblastic neoplasia, *Clin Endocrinol (Oxf)* 29:583-592, 1988.

1690 (Ventana-emergente - Popup)

Kennedy RL, Darne J, Griffiths H, et al: Thyroid-stimulatory effects of human chorionic gonadotropin in early pregnancy, *Horm Res* 33:177-183, 1990.

1691 (Ventana-emergente - Popup)

Lowe TW, Cunningham FG:

Pregnancy and thyroid disease, *Clin Obstet Gynecol* 34:72-80, 1991.

1692 (Ventana-emergente - Popup)

van Stiphout WAHJ, Hofman A, de Bruijn AM: Serum lipids in young women before, during, and after pregnancy, *Am J Epidemiol* 126:922-928, 1987.

1693 (Ventana-emergente - Popup)

van Stiphout WAHJ, Hofman A, de Bruijn AM: Serum lipids in young women before, during, and after pregnancy, *Am J Epidemiol* 126:922-928, 1987.

1694 (Ventana-emergente - Popup)

Studd JW, Wood S:

Serum and urinary proteins in pregnancy. In Wynn RM, editor: *Obstetrics and gynecology annual*, New York, 1976, Appleton- Century-Crofts.

1695 (Ventana-emergente - Popup)

Davison JM:

The urinary system. In Hytten F, Chamberlain G, editors: *Clinical physiology in obstetrics*, Oxford, 1980, Blackwell Scientific Publications.

1696 (Ventana-emergente - Popup)

van Geuns HJ, van Kessel H:

Creatinine in amniotic fluid and fetal renal function. In Fairweather DVI, Eskes TKAB, editors: *Amniotic fluid: research and clinical application*, ed 2, Amsterdam, 1978, Excerpta Medica.

1697 (Ventana-emergente - Popup)

Spillman T, Cotton DB:

Current perspectives in the assessment of fetal pulmonary surfactant status with amniotic fluid, *CRC Rev Clin Lab Sci* 27:341-389, 1989.

1698 (Ventana-emergente - Popup)

Hallman M:

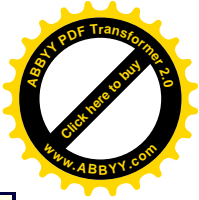
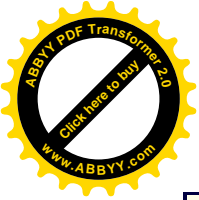
Recycling surfactant: a review of human amniotic fluid as a source of surfactant for treatment of respiratory distress syndrome, *Rev Perinatal Med* 6:197-226, 1989.

1699 (Ventana-emergente - Popup)

Cochrane CG, Revak SD:

Pulmonary surfactant protein B (SP-B): structure-function relationships, *Science* 254:566-568, 1991.

1700 (Ventana-emergente - Popup)



Martin RJ, Fanaroff AA, Skalina MEL:

The respiratory system. In Fanaroff AA, Martin RJ, editors: Behrman's neonatal/perinatal medicine, St. Louis, 1983, Mosby.

Reynolds MS, Wallander KA:

Use of surfactant in the prevention and treatment of neonatal respiratory distress syndrome, Clin Pharmacol 8:559-576, 1989.

1701 (Ventana-emergente - Popup)

Shapiro DL:

The development of surfactant replacement therapy and the various types of replacement surfactants, Semin Perinatol 12:174-179, 1988.

1702 (Ventana-emergente - Popup)

Jobe A:

Metabolism of endogenous surfactant and exogenous surfactants for replacement therapy, Semin Perinatol 12:231-244, 1988.

1703 (Ventana-emergente - Popup)

Kleihauer E:

The hemoglobins. In Stave U, editor: Perinatal physiology, New York, 1978, Plenum Publishing.

1704 (Ventana-emergente - Popup)

Hecht F, Jones RT, Koler RD:

Newborn infants with Hb Portland 1, an indicator of α -chain deficiency, Ann Hum Genet 31:215-218, 1967.

1705 (Ventana-emergente - Popup)

Hecht F, Jones RT, Koler RD:

Newborn infants with Hb Portland 1, an indicator of α -chain deficiency, Ann Hum Genet 31:215-218, 1967.

1706 (Ventana-emergente - Popup)

Avery ME, Mead J:

Surface properties in relation to atelectasis and hyaline membrane disease, Am J Dis Child 97:517-523, 1959.

1707 (Ventana-emergente - Popup)

Clements JA, Platzker ACG, Tierney DF, et al: Assessment of the risk of respiratory distress syndrome by a rapid test for surfactant in amniotic fluid, N Engl J Med 286:1077-1081, 1972.

1708 (Ventana-emergente - Popup)

Shapiro DL:

The development of surfactant replacement therapy and the various types of replacement surfactants, Semin Perinatol 12:174-179, 1988.

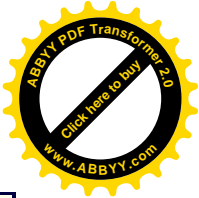
Jobe A:

Metabolism of endogenous surfactant and exogenous surfactants for replacement therapy, Semin Perinatol 12:231-244, 1988.

1709 (Ventana-emergente - Popup)

Robertson B:

Corticosteroids and surfactant for prevention of neonatal RDS, Ann Med 25:285-288,



1993.

1710 (Ventana-emergente - Popup)

Liley AW:

The administration of blood transfusions to the foetus in utero, Triangle 7:184-189,

1966.

1711 (Ventana-emergente - Popup)

Posner BI:

Insulin metabolizing enzyme activities in human placental tissue, Diabetes 22:552-563,

1973.

1712 (Ventana-emergente - Popup)

Klopper A:

Placental metabolism. In Hytten F, Chamberlain G, editors: Clinical physiology in obstetrics, Oxford, 1980, Blackwell Scientific Publications.

1713 (Ventana-emergente - Popup)

Cunningham FG, Lindheimer MD: Hypertension in pregnancy, N Engl J Med 326:927-932, 1992.

1714 (Ventana-emergente - Popup)

Cunningham FG, Lindheimer MD: Hypertension in pregnancy, N Engl J Med 326:927-932, 1992.

1715 (Ventana-emergente - Popup)

Sundaram SG, Goldstein PJ, Manimekalai S, et al: Alpha-fetoprotein and screening markers of congenital disease, Reprod Med 12:481-492, 1992.

1716 (Ventana-emergente - Popup)

Merkatz IR, Nitowsky AM, Macri JN, et al:

An association between low maternal serum alpha-fetoprotein and fetal chromosome abnormalities, Am J Obstet Gynecol 148:886-894, 1984.

1717 (Ventana-emergente - Popup)

Cheng EY, Luthy DA, Zebelman AM, et al:

A prospective evaluation of a second trimester screening test for fetal Down syndrome using maternal serum alpha-fetoprotein, HCG, and unconjugated estriol, Obstet Gynecol 81:72-76, 1993.

Haddow JE, Palomaki GE, Knight GJ, et al:

Prenatal screening for Down's syndrome with use of maternal serum markers, N Engl J Med 327:588-593, 1992.

1718 (Ventana-emergente - Popup)

Martinez F, Trounson, A:

An analysis of factors associated with ectopic pregnancy in a human in vitro fertilization program, Fertil Steril 45:79-87, 1986.

1719 (Ventana-emergente - Popup)

Carson SA, Buster JE:

Ectopic pregnancy, N Engl J Med 329: 1174-1180, 1993.

1720 (Ventana-emergente - Popup)

Carson SA, Buster JE:

Ectopic pregnancy, N Engl J Med 329:1174-1180, 1993.



1721 (Ventana-emergente - Popup)

Palomaki GE, Knight GJ, Haddow JE, et al: Prospective intervention trial of a screening protocol to identify fetal trisomy 18 using maternal serum alpha-fetoprotein, unconjugated oestriol, and human chorionic gonadotropin, *Prenatal Diagn* 12:925-930, 1992.

1722 (Ventana-emergente - Popup)

Haddow JE, Palomaki GE, Knight GJ, et al: Prenatal screening for Down's syndrome with use of maternal serum markers, *N Engl J Med* 327:588-593, 1992.

Mancini G, Peronam M, Dall'Amico CD, et al: HCG, AFP, and uE3 patterns in the 14-20th weeks of Down syndrome pregnancies, *Prenatal Diagn* 12:619-624, 1992.

1723 (Ventana-emergente - Popup)

Carl J, Christensen M, Mathiesen O:

Human placental lactogen (HPL) model for the normal pregnancy, *Placenta* 12:289-298, 1991.

1724 (Ventana-emergente - Popup)

Little B, Billar RB:

Endocrine disorders. In Romney SL, Gray MJ, Little AB, et al, editors: *Gynecology and obstetrics: the health care of women*, New York, 1975, McGraw-Hill.

1725 (Ventana-emergente - Popup)

Mancini G, Peronam M, Dall'Amico CD, et al: HCG, AFP, and uE3 patterns in the 14-20th weeks of Down syndrome pregnancies, *Prenatal Diagn* 12:619-624, 1992.

Carl J, Christensen M, Mathiesen O:

Human placental lactogen (HPL) model for the normal pregnancy, *Placenta* 12:289-298, 1991.

1726 (Ventana-emergente - Popup)

Gluck L, Kulovich MV: Lecithin/sphingomyelin ratios in amniotic fluid in normal and abnormal pregnancies, *Am J Obstet Gynecol* 115:539-546, 1973.

1727 (Ventana-emergente - Popup)

Spillman T, Cotton DB:

Current perspectives in the assessment of fetal pulmonary surfactant status with amniotic fluid, *CRC Rev Clin Lab Sci* 27:341-389, 1989.

1728 (Ventana-emergente - Popup)

Gluck L, Kulovich MV: Lecithin/sphingomyelin ratios in amniotic fluid in normal and abnormal pregnancies, *Am J Obstet Gynecol* 115:539-546, 1973.

1729 (Ventana-emergente - Popup)

Kulovich MV, Hallman MB, Gluck L:

The lung profile I: Normal pregnancy, *Am J Obstet Gynecol* 135:57-63, 1979.

Kulovich MV, Gluck L:

The lung profile II: Complicated pregnancy, *Am J Obstet Gynecol* 135:64-70, 1979.

1730 (Ventana-emergente - Popup)

Bent AE, Gray JH, Luther ER, et al:

Assessment of fetal lung maturity: relationship of gestational age and pregnancy



complications to phosphatidylglycerol levels, Am J Obstet Gynecol 139:664-669, 1981.

1731 (Ventana-emergente - Popup)

Spillman T, Cotton DB, Lynn SC Jr, Bretaudiere JP: Removal of a component interfering with phosphatidylglycerol estimation in the "Helena" system for amniotic fluid phospholipids, Clin Chem, 30:737-740, 1984.

1732 (Ventana-emergente - Popup)

Dubin SB:

The laboratory assessment of fetal lung maturity, Am J Clin Pathol 97:836-848, 1992.

1733 (Ventana-emergente - Popup)

Clements JA, Platzker ACG, Tierney DF, et al: Assessment of the risk of respiratory distress syndrome by a rapid test for surfactant in amniotic fluid, N Engl J Med 286:1077-1081, 1972.

1734 (Ventana-emergente - Popup)

Sher G, Statland BE, Freer DE, et al: Assessing fetal lung maturation by the foam stability index assay, Obstet Gynecol 52:673-677, 1978.

1735 (Ventana-emergente - Popup)

Shinitzky M, Goldfisher A, Bruck A:

A new method for assessment of fetal lung maturity, Br J Obstet Gynecol 83:833-844, 1976.

1736 (Ventana-emergente - Popup)

Russell JC:

A calibrated fluorescence polarization assay for assessment of fetal lung maturity, Clin Chem 33:1177-1184, 1987.

1737 (Ventana-emergente - Popup)

Herbert WNP, Chapman JF, Schnoor MM: Role of the TDx FLM assay in fetal lung maturity, Am J Obstet Gynecol 168:808-812, 1993.

1738 (Ventana-emergente - Popup)

Duck-Chong, CG:

Lamellar body phospholipid content of amniotic fluid: a possible index of fetal lung maturity, Am J Obstet Gynecol 136:191-196, 1979.

1739 (Ventana-emergente - Popup)

Dubin S:

Determination of lamellar body size, number density and concentration by differential light scattering from amniotic fluid: physical significance of A650, Clin Chem 34:938-943, 1988.

1740 (Ventana-emergente - Popup)

Dubin S:

Characterization of amniotic fluid lamellar bodies by resistive-pulse counting: relationship to measures of fetal lung maturity, Clin Chem 35:612-616, 1989.

1741 (Ventana-emergente - Popup)

Dubin S:

Determination of lamellar body size, number density and concentration by differential light scattering from amniotic fluid: physical significance of A650, Clin Chem 34:938-943, 1988.



1742 (Ventana-emergente - Popup)

Dubin S:

Characterization of amniotic fluid lamellar bodies by resistive-pulse counting: relationship to measures of fetal lung maturity, Clin Chem 35:612-616, 1989.

1743 (Ventana-emergente - Popup)

Herbert WNP, Chapman JF, Schnoor MM:

Role of the TDx FLM assay in fetal lung maturity, Am J Obstet Gynecol 168:808-812, 1993.

Garite TJ, Freeman RK, Nageotte MP:

Fetal maturity cascade: a rapid and cost effective method for fetal maturity testing, Obstet Gynecol 67:619-622, 1986.

Herbert WNP, Chapman JF:

Clinical and economic considerations associated with testing for fetal lung maturity, Am J Obstet Gynecol 155:820-823, 1986.

1744 (Ventana-emergente - Popup)

Liley AW:

Amniocentesis and amniography in hemolytic disease. In Greenhill JP, editor: Yearbook of obstetrics and gynecology, 1964-1965 series, St. Louis, 1964, Mosby.

1745 (Ventana-emergente - Popup)

Pennoyer MM, Hartman AF Sr: Management of infants born of diabetic mothers, Postgrad Med 18:199-206, 1955.

1746 (Ventana-emergente - Popup)

Sundaram SG, Goldstein PJ, Manimekalai S, et al: Alpha-fetoprotein and screening markers of congenital disease, Reprod Med 12:481-492, 1992.

1747 (Ventana-emergente - Popup)

Martinez F, Trounson, A:

An analysis of factors associated with ectopic pregnancy in a human in vitro fertilization program, Fertil Steril 45:79-87, 1986.

1748 (Ventana-emergente - Popup)

Benzie RJ, Doran TA, Harkins JL, et al: Composition of the amniotic fluid and material serum in pregnancy, Am J Obstet Gynecol 119:798-810, 1982.

1749 (Ventana-emergente - Popup)

Liley AW:

Liquor amnii analysis in the management of the pregnancy complicated by rhesus sensitization, Am J Obstet Gynecol 82:1359-1370;1961.

1750 (Ventana-emergente - Popup)

Liley AW:

Liquor amnii analysis in the management of the pregnancy complicated by rhesus sensitization, Am J Obstet Gynecol 82:1359-1370;1961.

1751 (Ventana-emergente - Popup)

Greene MF, Fenci M deM, Tulchinsky D: Biochemical aspects of pregnancy. In Tietz N, editor: Textbook of clinical chemistry, Philadelphia, Penn., 1986, Saunders.

1752 (Ventana-emergente - Popup)

van Kessel H:



Spectrophotometry of amniotic fluid. In Sandler M, editor: Amniotic fluid and its clinical significance, New York, 1981, Marcel Dekker.

1753 (Ventana-emergente - Popup)

Brazie JV, Bowes WA, Ibbott FA:

An improved, rapid procedure for the determination of amniotic fluid bilirubin and its use in the prediction of the course of Rh-sensitized pregnancies, Am J Obstet Gynecol 104:80-86, 1969.

Mallikarjuneswara VR, Clemetson CAB, Carr JJ.:

Determination of bilirubin in amniotic fluid, Clin Chem 16:180-184, 1970.

Hochberg CJ, Witheiler AP, Cook H:

Accurate amniotic fluid bilirubin analysis from the bloody tap, Am J Obstet Gynecol 126:531-534, 1976.

1754 (Ventana-emergente - Popup)

Queenan JT:

Amniotic fluid analysis, Clin Obstet Gynecol 14:505-536, 1971.

1755 (Ventana-emergente - Popup)

Liley AW:

Liquor amnii analysis in the management of the pregnancy complicated by rhesus sensitization, Am J Obstet Gynecol 82:1359-1370;1961.

1756 (Ventana-emergente - Popup)

Freer DE, Statland BE:

Measurement of amniotic fluid surfactant, Clin Chem 27:1629- 1641, 1981.

Tsao FH, Zachman RD:

Prenatal assessment of fetal lung maturations: a critical review of amniotic fluid phospholipid tests. In Farrell PM, editor: Lung development: biological and clinical perspectives, vol 2, Neonatal respiratory distress, New York, 1982, Academic Press.

Chapman JF, Herbert WNP:

Current methods for evaluating fetal lung maturity, Lab Med 17:597-602, 1986.

1757 (Ventana-emergente - Popup)

Clark HW, Jacobson W:

Detection of pulmonary surfactant in human amniotic fluid by polarized light microscopy, J Physiol 418:139P, 1989.

Clements PA, Platzker ACG, Tierney DF, et al:

Assessment of the risk of respiratory distress by a rapid test for surfactant in the amniotic fluid, N Engl J Med 286:1077, 1972.

1758 (Ventana-emergente - Popup)

Gluck L, Kulovich MV, Borer RC Jr, et al: Phosphatidylinositol and phosphatidylglycerol in amniocentesis, Am J Obstet Gynecol 109:440, 1971.

1759 (Ventana-emergente - Popup)

Clements PA, Platzker ACG, Tierney DF, et al: Assessment of the risk of respiratory distress by a rapid test for surfactant in the amniotic fluid, N Engl J Med 286:1077, 1972.

1760 (Ventana-emergente - Popup)

Bradley CA, Salhany KE, Entman SS, et al: Automated enzymatic measurement of lecithin, sphingomyelin, and phosphatidylglycerol in amniotic fluid, Clin Chem 33:81, 1987.



1761 (Ventana-emergente - Popup)

Dubin SB:

Assessment of fetal lung maturity by laboratory methods, Clin Lab Med 12(3):603-620, 1992.

1762 (Ventana-emergente - Popup)

Spillman T, Cotton DB:

Current perspectives in the assessment of fetal pulmonary surfactant status with amniotic fluid, CRC Rev Clin Lab Sci 27:341-389, 1989.

1763 (Ventana-emergente - Popup)

Richardson DK, Torday JS:

Racial differences in predictive value of the lecithin/spingomyelin ratio, Am J Obstet Gynecol 170:1273-1278, 1994.

1764 (Ventana-emergente - Popup)

Richardson DK, Torday JS:

Racial differences in predictive value of the lecithin/spingomyelin ratio, Am J Obstet Gynecol 170:1273-1278, 1994.

1765 (Ventana-emergente - Popup)

Hallman M, Kulovich M, Kirkpatrick E, et al: Phosphatidylinositol and phosphatidylglycerol in amniotic fluid: indices in lung maturity, Am J Obstet Gynecol 125:613, 1976.

1766 (Ventana-emergente - Popup)

Chapman JF, Phillips JC, Rosenthal MA, Herbert WNP: Evaluation of the PG-numeric assay for semi-automated analysis for phosphatidylglycerol in amniotic fluid, Clin Chem 36:1974-1977, 1990.

1767 (Ventana-emergente - Popup)

Clements JA, Platzker ACG, Tierney DF: Assessment of risk of respiratory distress syndrome by a rapid test for surfactant in amniotic fluid, N Engl J Med 286:1077-1081, 1972.

1768 (Ventana-emergente - Popup)

Dubin SB:

Assessment of fetal lung maturity by laboratory methods, Clin Lab Med 12(3):603-620, 1992.

1769 (Ventana-emergente - Popup)

Stratland BE, Freer DE:

Evaluation of two assays of functional surfactant in amniotic fluid, surface tension lowering ability, and the foam stability index test, Clin Chem 25:1770-1773, 1979.

1770 (Ventana-emergente - Popup)

Sher G, Statland BE, Freer DE:

Clinical evaluation of the quantitative foam stability index test, Obstet Gynecol 55:617-620, 1980.

1771 (Ventana-emergente - Popup)

Tait JF, Franklin RW, Simpson JB, et al: Improved fluorescence polarization assay for use in evaluating fetal lung maturity. I. Development of the assay procedure, Clin Chem 32:248, 1986.

1772 (Ventana-emergente - Popup)



Russell J, Cooper C, et al:

Multicenter evaluation of TDx test for assessing fetal lung maturity, Clin Chem 15:1005-1010, 1989.

1773 (Ventana-emergente - Popup)

Wehmann RE, Blithe DL, Flack MR, Nisula BC: Metabolic clearance rate and urinary clearance of purified beta-core, J Clin Endocrinol Metab 69:510-517, 1989.

1774 (Ventana-emergente - Popup)

Ascheim S, Zondek B:

Die Schwangerschaftsdiagnose aus dem Harn durch 94. Nachweis des Hypophysenvorderlappen-hormone II. Praktische und theoretische Ergebnisse aus den Harnuntersuchungen, Klin Wochenschr 7:1453-1457, 1928.

1775 (Ventana-emergente - Popup)

Chard T:

Pregnancy tests: a review, Hum Reprod 7:701-710, 1992.

1776 (Ventana-emergente - Popup)

Mishalani SH, Seliktar J, Braunstein GD:

Four rapid serum-urine combination assays of choriogonadotropin (hCG) compared and assessed for their utility in quantitative determinations of hCG, Clin Chem 40:1944-1949, 1994.

1777 (Ventana-emergente - Popup)

Mishalani SH, Seliktar J, Braunstein GD:

Four rapid serum-urine combination assays of choriogonadotropin (hCG) compared and assessed for their utility in quantitative determinations of hCG, Clin Chem 40:1944-1949, 1994.

1778 (Ventana-emergente - Popup)

Vankrieken L, De Hertogh R:

Rapid, automated quantification of total human chorionic gonadotropin in serum by a chemiluminescent enzyme immunometric assay, Clin Chem 41:36-40, 1995.

1779 (Ventana-emergente - Popup)

Ooi DS, Perkins SL, Claman P, Muggah HF: Serum human chorionic gonadotrophin levels in early pregnancy, Clin Chem Acta 181:281-292, 1989.

1780 (Ventana-emergente - Popup)

Lenton EA, Hooper M, King H, et al:

Normal and abnormal implantation in spontaneous in-vivo and in-vitro human pregnancies, J Reprod Fertil 92:555-565, 1991.

1781 (Ventana-emergente - Popup)

Kent A, Kitau MJ, Chard T:

Absence of diurnal variation in urinary chorionic gonadotrophin excretion at 8-13 weeks gestation, Br J Obstet Gynecol 69:1180-1181, 1991.

1782 (Ventana-emergente - Popup)

Rao CV, Hussa RO, Carmen FR, et al: Stability of human chorionic gonadotropin and its α subunit in human blood, Am J Obstet Gynecol 146:65-68, 1983.

1783 (Ventana-emergente - Popup)

Cole LA, Kardana A:



Discordant results in human chorionic gonadotropin assays, *Clin Chem* 38:263-270, 1992.

1784 (Ventana-emergente - Popup)

Lee CL, Hes R, Shephert JH, et al:

The purification and development of a radioimmunoassay for beta-core fragment of human chorionic gonadotrophin in urine: applications as a marker of gynecological cancer in premenopausal women, *J Endocrinol* 130:481-489, 1991.

1785 (Ventana-emergente - Popup)

Schwarz S, Berger P, Wick G:

Epitope-selective monoclonal antibody based immunoradiometric assay of predictable specificity for differential measurement of choriogonadotropin and its subunits, *Clin Chem* 31:1322-1328, 1985.

1786 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Krieg AF, Kjeldsberg CR:

Cerebrospinal fluid and other body fluids. In Henry JB, editor: *Clinical diagnosis and management by laboratory methods*, Philadelphia, 1991, Saunders.

1787 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Light RW, MacGregor MI, Luchsinger PC, Ball WC Jr:

Pleural effusions: the diagnostic separation of transudates and exudates, *Ann Intern Med* 77:507-513, 1972.

1788 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Light RW, MacGregor MI, Luchsinger PC, Ball WC Jr:

Pleural effusions: the diagnostic separation of transudates and exudates, *Ann Intern Med* 77:507-513, 1972.

1789 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Krieg AF, Kjeldsberg CR:

Cerebrospinal fluid and other body fluids. In Henry JB, editor: *Clinical diagnosis and management by laboratory methods*, Philadelphia, 1991, Saunders.

1790 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Pare P, Talbot J, Hoefs JC:

Serum-ascites albumin concentration gradient: a physiologic approach to the differential diagnosis of ascites, *Gastroenterology* 85:240-244, 1983.

Rector WG Jr, Reynolds TB:

Superiority of the serum-ascites albumin difference over the ascites total protein concentration in the separation of "transudative" and "exudative" ascites, *Am J Med* 77:83-85, 1984.

1791 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Light RW, Ball WC Jr:

Glucose and amylase in pleural effusions, *JAMA* 225:257-260, 1973.

Carr DT, Mayne JG:

Pleurisy with effusion in rheumatoid arthritis, with reference to the low concentration of glucose in pleural fluid, *Am Rev Respir Dis* 85:345-350, 1962.

1792 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Dodson WH, Hollingsworth JW:

Pleural effusion in rheumatoid arthritis: impaired transport of glucose, *N Engl J Med* 275:1337-1342, 1966.

1793 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Sokolowski JW Jr, Burgher LW, Jones FL Jr, et al:

Guidelines for thoracentesis and needle biopsy of the pleura, *Am Rev Resp Dis* 140:257-258, 1989.

1794 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)



Staats BA, Ellefson RD, Budahn LL, et al:

The lipoprotein profile of chylous and nonchylous pleural effusions, *Mayo Clin Proc* 55:700-704, 1980.

1795 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Sherr HP, Light RW, Merson MH, et al:

Origin of pleural fluid amylase in esophageal rupture, *Ann Intern Med* 76:985-986, 1972.

1796 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Dye RA, Lafaret EG:

Esophageal rupture: diagnosis by pleural fluid pH, *Chest* 66:454-456, 1974.

Abbott OA, Mansor KA, Logan WD:

Atraumatic so-called spontaneous rupture of the esophagus, *J Thorac Cardiovasc Surg* 59:67-82, 1970.

1797 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Geokas MC, Olsen H, Carmack C, Rinderknecht H:

Studies on the ascites and pleural effusion in acute pancreatitis, *Gastroenterology* 58:950, 1970.

1798 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Keith LM, Zollinger RM, McCleery RS:

Peritoneal fluid amylase determinations as an aid in diagnosis of acute pancreatitis, *Arch Surg* 61:930-936, 1950.

1799 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Donowitz M, Kerstein MD, Spiro HM:

Pancreatic ascites, *Medicine* 53:183-195, 1974.

1800 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Salt WB, Schenker S:

Amylase\Mits clinical significance: a review of the literature, *Medicine* 55:269-289, 1976.

1801 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Salt WB, Schenker S:

Amylase\Mits clinical significance: a review of the literature, *Medicine* 55:269-289, 1976.

1802 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Goldman M, Goldman G, Fleischner FG:

Pleural fluid amylase in acute pancreatitis, *N Engl J Med* 266:715-718, 1962.

1803 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Lee YN:

Alkaline phosphatase in intestinal perforation, *JAMA* 208:361, 1969.

1804 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Delany HM, Moss CM, Carnevale N:

The use of enzyme analysis of peritoneal blood in the clinical assessment of abdominal organ injury, *Surg Gynecol Obstet* 42:161-167, 1976.

1805 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Ropes MW, Rossmesl EC, Bauer W:

The origin and nature of normal human synovial fluid, *J Clin Invest* 19:795-799, 1940.

1806 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Hamerman D, Schuster H:

Hyaluronate in normal synovial fluid, *J Clin Invest* 37:57-64, 1958.

Hoepflich PD, Ward JR:

The fluids of the parenteral body cavities, New York, 1959, Grune & Stratton.

Pekin TJ, Zvaifler NJ:



Hemolytic complement in synovial fluid, *J Clin Invest* 43:1372-1382, 1964.

Pruzanski W, Russell ML, Gordon DA, Ofryzlo MA:

Serum and synovial fluid proteins in rheumatoid arthritis and degenerative joint diseases, *Am J Med Sci* 265:483-490, 1973.

1807 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

McCarty DJ: Synovial fluid. In McCarty DJ, Koopman WJ, editors:

Arthritis and allied conditions, a textbook of rheumatology, ed 12, Philadelphia, 1993, Lea & Febiger.

1808 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Borenstein DG, Gibbs CA, Jacobs RP:

Gas-liquid chroma-tographic analysis of synovial fluid:h succinic acid and lactic acid as markers of septic arthritis, *Arthritis Rheum* 25:947-953, 1982.

1809 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Baker DG:

Chemistry, serology, and immunology. In Gatter RA, Schumacher HR: *A practical handbook of joint fluid analysis*, ed 2, Philadelphia, 1991, Lea & Febiger.

1810 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Wu AHB, Wong SS, Johnson KG, et al:

Evaluation of the triage system for emergency drugs-of-abuse testing in urine, *J Anal Toxicol* 17:241-245, 1993.

1811 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Binder SR, Adams AK, Regalia M, et al:

Standardization of multi-wavelength UV detector for liquid chromatography\Nbased toxicological analysis, *J Chromatogr* 550:449-459, 1991.

1812 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

DeGroot LJ, Niepomnisczcze H:

Biosynthesis of thyroid hor-mone: basic and clinical aspects, *Metabolism* 26:665-718, 1977.

1813 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Wolff J:

Transport of iodide and other anions in the thyroid gland, *Physiol Rev* 44:45-79, 1964.

1814 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

DeGroot LJ, Niepomnisczcze H:

Biosynthesis of thyroid hor-mone: basic and clinical aspects, *Metabolism* 26:665-718, 1977.

1815 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

DeGroot LJ, Niepomnisczcze H:

Biosynthesis of thyroid hor-mone: basic and clinical aspects, *Metabolism* 26:665-718, 1977.

1816 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Dumont JE:

The action of thyrotropin on thyroid metabolism, *Vitam Horm* 29:287-412, 1971.

1817 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Woeber KA, Ingbar SH:

The interactions of the thyroid hormones with binding protein. In Greer MA, Solomon DH, editors: *Thyroid, American handbook of physiology*, vol 3, Washington, D.C., 1973, American Physiological Society.

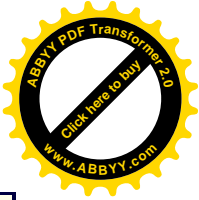
1818 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Chopra IJ:

An assessment of daily production and significance of thyroidal 3,3'5'-triiodothyronine (reverse T₃) in man, *J Clin Invest* 58:32-40, 1976.

Schimmel M, Utiger RD:

Thyroidal and peripheral production of thyroid hormones, *Ann Intern Med* 87:760-768, 1977.



1819 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Schimmel M, Utiger RD:

Thyroidal and peripheral production of thyroid hormones, *Ann Intern Med* 87:760-768, 1977.

1820 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Chopra IJ, Solomon DH, Chopra U, et al:

Pathways of metabolism of thyroid hormones, *Recent Prog Horm Res* 34:521-567, 1978.

1821 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Oppenheimer JH, Samuels HH, editors:

Molecular basis of thyroid hormone action, New York, 1983, Academic Press.

1822 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Edelman IS, Ismail-Beigi F:

Thyroid thermogenesis and active sodium transport, *Recent Prog Horm Res* 30:235-257, 1974.

1823 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Erfurth EM, Nordén NE, Hedner P, et al:

Normal reference interval for thyrotropin response to thyroliberin: dependence on age, sex, free thyroxine index and basal concentrations of thyrotropin, *Clin Chem* 30:196-199, 1984.

1824 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Wolff J:

Iodide goiter and pharmacologic effects of excess iodide, *Am J Med* 47:101-124, 1969.

1825 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Wolff J:

Iodide goiter and pharmacologic effects of excess iodide, *Am J Med* 47:101-124, 1969.

1826 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Mason JW:

Amiodarone, *N Engl J Med* 316:455-466, 1987.

1827 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Abuid J, Stinson DA, Larsen PR:

Serum triiodothyronine and thyroxine in the neonate and the acute increases in these hormones following delivery, *J Clin Invest* 52:1195-1199, 1973.

1828 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Selenkow HA, Birnbaum MD, Hollander CS:

Thyroid function and dysfunction during pregnancy, *Clin Obstet Gynecol* 16:66-68, 1973.

1829 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Portnay GI, O'Brian JT, Bush J, et al:

The effect of starvation on the concentration and binding of thyroxine and triiodothyronine in serum and on the response to TRH, *J Clin Endocrinol Metab* 39:191-194, 1974.

1830 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

McKenzie JM, Zakarija M, Sato A:

Humoral immunity in Graves' disease, *Clin Endocrinol Metab* 7:31-45, 1978.

1831 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Christiansen NJB, Sierboek-Nielson K, Hansen JEM, Christiansen LK:

Serum thyroxine in the early phase of subacute thyroiditis, *Acta Endocrinol* 64:359-363, 1970.

Dorfman SG, Cooperman MT, Nelson RL, et al:

Painless thyroiditis and transient hyperthyroidism without goiter, *Ann Intern Med* 86:24-28, 1977.

1832 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Roti E, Emerson CH:

Clinical review 29: postpartum thyroiditis, *J Clin Endocrinol Metab* 74:3-5, 1992.



Gerstein HC:

How common is postpartum thyroiditis? *Arch Intern Med* 150:1397-1400, 1990.

1833 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Roti E, Emerson CH:

Clinical review 29: postpartum thyroiditis, *J Clin Endocrinol Metab* 74:3-5, 1992.

1834 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

LiVolsi VA:

Postpartum thyroiditis: the pathology slowly unravels [editorial], *Am J Clin Pathol* 100:193-195, 1993.

1835 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

McKenzie JM, Zakarija M:

Pathogenesis of neonatal Graves' disease, *J Endocrinol Invest* 2:183-189, 1978.

1836 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Brown J, Solomon DH, Beall GN, et al:

Autoimmune thyroid disease\MGraeves' and Hashimoto's, *Ann Intern Med* 88:379-391, 1978.

1837 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Dussault JH, Coulombe P, Laberge C, et al:

Preliminary report on a mass screening program for neonatal hypothyroidism, *J Pediatr* 86:670-674, 1975.

1838 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Maxon HR III, Saenger EL, Thomas SR, et al:

Clinically important radiation-associated thyroid disease: a controlled study, *JAMA* 44:1802-1805, 1980.

1839 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Wolff J:

Transport of iodide and other anions in the thyroid gland, *Physiol Rev* 44:45-79, 1964.

Snyder PJ, Utiger RD:

Response to thyrotropin-releasing hormone (TRH) in normal man, *J Clin Endocrinol Metab* 34:380-385, 1972.

1840 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Werner SC, Spooner M:

A new and simple test for hyperthyroidism employing l-triiodothyronine and the 24 hour ¹³¹I uptake method, *Bull NY Acad Med* 31:139-145, 1955.

1841 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Surks MI, Chopra IJ, Mariash CN:

American Thyroid Association guidelines for the use of laboratory tests in thyroid disorders, *JAMA* 263:1529-1532, 1990.

1842 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Larsen PR, Alexander NM, Chopra IJ, et al:

Committee on Nomenclature, American Thyroid Association: Revised nomenclature for tests of thyroid hormones and thyroid-related proteins in serum [letter to the editor], *J Clin Endocrinol Metab* 64:1089-1094, 1986.

1843 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Stein RB, Price L:

Evaluation of adjusted total thyroxine (free thyroxine index) as a measure of thyroid function, *J Clin Endocrinol Metab* 34:225-228, 1972.

1844 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Sawin CT, Chopra D, and Albano J:

The free triiodothyronine (T₃) index, *Ann Intern Med* 88:474-477, 1978.

1845 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Schlumberger M, De Vathaire F, Wu-Ahouju G, et al:

Post-operative surveillance of differentiated thyroid carcinoma: contributions of the ultra-sensitive TSH assay, 2704



Presse Méd 16:1791-1793, 1987.

1846 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

McKenzie JM, Zakarija M, Sato A:

Humoral immunity in Graves' disease, *Clin Endocrinol Metab* 7:31-45, 1978.

1847 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Surks MI, Chopra IJ, Mariash CN:

American Thyroid Association guidelines for the use of laboratory tests in thyroid disorders, *JAMA* 263:1529-1532, 1990.

Chopra IJ, Solomon DH, Hepner GW, et al:

Misleadingly low free thyroxine index and usefulness of reverse triiodothyronine measurement in nonthyroidal illnesses, *Ann Intern Med* 90:905-912, 1979.

Chopra IJ, Solomon DH, Chopra U, et al:

Alterations in circulating thyroid hormones and thyrotropin in hepatic cirrhosis: evidence for euthyroidism despite subnormal serum triiodothyronine, *J Clin Endocrinol Metab* 39:501-511, 1974.

Grenn JRB:

Thyroid function and thyroid regulation in euthyroid men with chronic liver disease: evidence of multiple abnormalities, *Clin Endocrinol* 7:453-461, 1977.

1848 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Chopra IJ, Solomon DH, Hepner GW, et al:

Misleadingly low free thyroxine index and usefulness of reverse triiodothyronine measurement in nonthyroidal illnesses, *Ann Intern Med* 90:905-912, 1979.

1849 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Inada M, Sterling K:

Thyroxine turnover and transport in Laënnec's cirrhosis of the liver, *J Clin Invest* 46:1275-1282, 1967.

1850 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Grenn JRB:

Thyroid function and thyroid regulation in euthyroid men with chronic liver disease: evidence of multiple abnormalities, *Clin Endocrinol* 7:453-461, 1977. 1987.

1851 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Tabei A, Shimoda S:

Increased TBG-T₄Nbinding capacity in acute hepatitis, *Folia Endocrinol* 49:1025-1033, 1973.

1852 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Schussler GC, Schaffner F, Korn F:

Increased serum thyroid hormone binding and decreased free hormone in chronic active liver disease, *N Engl J Med* 299:510-515, 1978.

1853 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Spector DA, Davis PJ, Helderman JH, et al:

Thyroid function and metabolic state in chronic renal failure, *Ann Intern Med* 85:724-730, 1976.

1854 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Lim VS, Fang VS, Katz A, et al:

Thyroid dysfunction in chronic renal failure, *J Clin Invest* 60:522-523, 1977.

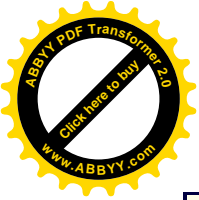
1855 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Cavalieri RR:

The effects of nonthyroid disease and drugs on thyroid function tests, *Med Clin North Am* 75:27-39, 1991.

1856 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Maxon H, Volle C, Hertzberg V, et al:



Variation in serum thyroxine concentrations with time after oral replacement dose, *Clin Nucl Med* 12:369-370, 1987.

1857 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Hay ID, Bayer MF, Kaplan MM, et al:

American Thyroid Association assessment of current free thyroid hormone and thyrotropin measurements and guidelines for future clinical assays, *Clin Chem* 37:2002-2008, 1991.

1858 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Spencer CA, Presti JSL, Patel A, et al:

Applications of a new chemiluminometric thyrotropin assay to subnormal measurement, *J Clin Endocrinol Metab* 70:453-460, 1990.

1859 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Hay ID, Bayer MF, Kaplan MM, et al:

American Thyroid Association assessment of current free thyroid hormone and thyrotropin measurements and guidelines for future clinical assays, *Clin*

1860 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Spencer CA, Presti JSL, Patel A, et al:

Applications of a new chemiluminometric thyrotropin assay to subnormal measurement, *J Clin Endocrinol Metab* 70:453-460, 1990.

1861 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Miles LEM, Hales CN:

Labeled antibodies and immunological assay systems, *Nature* 219:186-189, 1968.

Taimela E, Aalto M, Koshinen P, Irjala K:

Clinical and laboratory studies of time-resolved fluorescence immunoassays of thyrotropin and free triiodothyronine, *Clin Chem* 39:679-682, 1993.

1862 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Hay ID, Bayer MF, Kaplan MM, et al:

American Thyroid Association assessment of current free thyroid hormone and thyrotropin measurements and guidelines for future clinical assays, *Clin Chem* 37:2002-2008, 1991.

1863 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Taimela E, Tähtelä R, Koskinen P, et al:

Ability of two new thyrotropin (TSH) assays to separate hyperthyroid patients from euthyroid patients with low TSH, *Clin Chem* 40:101-105, 1994.

1864 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Marstein S:

Caution against spuriously increased thyrotropin values as determined by two-site immunoradiometric assays, *Clin Chem* 33:1290-1291, 1987.

1865 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Marstein S:

Caution against spuriously increased thyrotropin values as determined by two-site immunoradiometric assays, *Clin Chem* 33:1290-1291, 1987.

1866 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Chen I-W, Heminger LA, Barnes EL, et al:

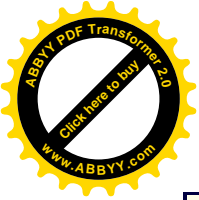
A sensitive radioimmunoassay (RIA) for detection of serum thyrotropin (TSH) in healthy subjects and patients with suppressed pituitary function, *J Nucl Med* 24:114, 1983.

1867 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Lipson A, Nickoloff EL, Hsu TH, et al:

A study of age-dependent changes in thyroid function tests in adults, *J Nucl Med* 20:1124-1130, 1979.

1868 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)



Ekins R:

The estimation of thyroxine in human plasma by an electrophoretic technique, *Clin Chim Acta* 5:453-459, 1960.

1869 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Prinsen JH, Schweisfurth H, Rasche B, Breuer J:

Comparison of three methods for the determination of serum alpha-antitrypsin in patients with pulmonary diseases, *Clin Physiol Biochem* 7:198-202, 1989.

1870 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Viedma JA, de la Iglesia, Parera M, Lopez MT:

A new automated turbidimetric immunoassay for quantifying α_1 -antitrypsin in serum, *Clin Chem* 32:1020-1022, 1986.

1871 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Carrell RW, Owen MC:

Alpha₁-antitrypsin: structure, variation and disease, *Essays Med Biochem* 4:83-119, 1978.

1872 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Cooper GR, editor:

Selected methods of clinical chemistry, 8:149-153, Washington, D.C., 1977, American Association for Clinical Chemistry.

1873 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Nethercott SE, Kalsheker NA:

Kinetic fluorimetric assay for alpha₁-antitrypsin elastase-inhibitory capacity in serum, *Clin Chem* 34:178-179, 1988.

1874 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Cox DW, Billingsley GD:

Oxidation of plasma alpha₁-antitrypsin in smokers and nonsmokers and by an oxidizing agent, *Am Rev Resp Dis* 130:594-9, 1984.

1875 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Brouwer J, Smekens F:

Determination of α_1 -antitrypsin in fecal extracts by enzyme immunoassay, *Clin Chim Acta* 189:173-180, 1990.

1876 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Wilson CM, McGilligan K, Thomas DW:

Determination of fecal α_1 -antitrypsin concentration by radial immunodiffusion: two systems compared, *Clin Chem* 34:372-376, 1988.

1877 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Buffone GJ, Shulman RJ:

Characterization and evaluation of immunochemical methods for the measurement of fecal α_1 -antitrypsin, *Am J Clin Pathol* 83:326-330, 1985.

1878 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Morse JO:

Alpha-₁-antitrypsin deficiency. Part 1, *N Engl J Med* 299:1045- 1048, 1978.

1879 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Morse JO:

Alpha-₁-antitrypsin deficiency. Part 1, *N Engl J Med* 299:1045- 1048, 1978.

1880 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Zegers ND, Classen E, Gerritse K, et al:

Detection of genetic variants of α_1 -antitrypsin with site-specific monoclonal antibodies, *Clin Chem* 37:1606-1611, 1991.

1881 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)



Harju L, Weber T, Alexandrova L, et al:

Colorimetric solid-phase minisequencing assay illustrated by detection of α_1 -antitrypsin Z mutation, *Clin Chem* 39:2282-2287, 1993.

1882 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Ritchie RF, Smith R:

Immunofixation II: application to typing of alpha-1-antitrypsin at acid pH, *Clin Chem* 22:1735-1737, 1976.

1883 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Gaidulis L, Muensch HA, Maslow WC, Borer WZ:

Optimizing reference values for the measurement of alpha-1-antitrypsin in serum: comparison of three methods, *Clin Chem* 29:1838-1840, 1983.

1884 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Tietz NW:

Clinical guide to laboratory tests, Philadelphia, 1983, Saunders.

1885 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Young DS, Jackson AJ:

Thin-layer chromatography of urinary carbohydrates: a comparative evaluation of procedures, *Clin Chem* 16:954-959, 1970.

1886 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Young DS, Jackson AJ:

Thin-layer chromatography of urinary carbohydrates: a comparative evaluation of procedures, *Clin Chem* 16:954-959, 1970.

Szustkiewicz C, Demetriou J:

Detection of some clinically important carbohydrates in plasma and urine by means of thin-layer chromatography, *Clin Chim Acta* 32:355, 1971.

1887 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Mukerjee H:

A kinetic method for determination of serum ceruloplasmin, *Clin Chem* 36:391-392, 1990.

Schosinsky KH, Lehmann HP, Beeler MF:

Measurement of ceruloplasmin from its oxidase activity in serum by use of *o*-dianisidine dihydrochloride, *Clin Chem* 20:1556-1563, 1974.

1888 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Curzone G, Spezler BE:

Inhibitors of ceruloplasmin, *Biochem J* 105:243-250, 1967.

1889 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Schosinsky KH, Lehmann HP, Beeler MF:

Measurement of ceruloplasmin from its oxidase activity in serum by use of *o*-dianisidine dihydrochloride, *Clin Chem* 20:1556-1563, 1974.

1890 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Milne DB, Johnson PE:

Assessment of copper status: effect of age and gender on reference ranges in healthy adults, *Clin Chem* 39:883-887, 1993.

1891 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Dass P, Meja M, Landes M, et al:

Check sample, *Clin Chem* 34:135-158, 1994.

1892 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Crane CR, Sanders DC, Abbot JN:

Cholinesterase use and interpretation of cholinesterase measurements. In Sunshine I, editor: *Methodology for analytical toxicology*, Cleveland, 1975, CRC Press.

1893 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)



Ammon R:

Die fermentative Spaltung des Acetylcholine, *Pflugers Arch Ges Physiol* 233:486-491, 1933.

1894 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Ravin HA, Tsou KC, Seligman AM:

Colorimetric estimation and histochemical demonstration of serum cholinesterase, *J Biol Chem* 191:843-857, 1951.

1895 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Ellman GL, Courtney KD, Andres V Jr, Featherstone RM:

A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochem Pharmacol* 7:88-95, 1961.

1896 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Brownson C, Watts DC:

The modification of cholinesterase activity by 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) included in the coupled spectrophotometric assay, *Biochem J* 131:369-374, 1973.

1897 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Abernethy MH, Fitzgerald HP, Ahern KM:

An enzymatic method for erythrocyte acetylcholinesterase, *Clin Chem* 34:1055-1057, 1988.

1898 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Johnson CD, Russel RL:

A rapid, simple radiometric assay for cholinesterase, suitable for multiple determinations, *Anal Biochem* 64:229-238, 1975.

1899 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Parvari R, Pecht I, Soreq H:

A microfluorometric assay for cholinesterase, suitable for multiple kinetic determinations of picomoles of released thiocholine, *Anal Biochem* 133:450-456, 1983.

1900 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Baum G, Ward FB:

General enzyme studies with a substrate-selective electrode: characterization of cholinesterase, *Anal Biochem* 42:487-493, 1971.

1901 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Brock A:

Inter and intraindividual variations in plasma cholinesterase activity and substance concentration in employees of an organophosphorous insecticide factory, *Br J Ind Med* 48:562-567, 1991.

1902 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Dass P, Meja M, Landes M, et al:

Check sample, *Clin Chem* 34:135-158, 1994.

1903 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Zsigmond EK, Downs JR:

Plasma cholinesterase activity in newborns and infants, *Can Anaesth Soc* 18:278-283, 1971.

1904 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Howard J, East N, Chaney J:

Plasma cholinesterase activity in early pregnancy, *Arch Environ Health* 33:277-279, 1978.

1905 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Kaplan E, Tildon JT:

Changes in red cell enzyme activity in relation to red cell survival in infancy, *Pediatrics* 32:371-375, 1963.

1906 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Sager R:

Explorations on the origin of cancer, *Focus* 2/3:1-3, 1983.

1907 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Aaronson SA:



Growth factors and cancer, *Science* 254:1146-1153, 1991.

1908 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Cantley LC, Auger KR, Carpenter C, et al:

Oncogenes and signal transduction, *Cell* 64:281-302, 1991.

1909 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Niman HL:

Detection of oncogene-related proteins with site-directed monoclonal antibody probes, *J Clin Lab Anal* 1:28-41, 1987.

1910 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

EVAC:

Rapport eerste screeningsronde, Leidschendam, 1980, Ministerie van Volksgezondheid en Milieuhygiene.

1911 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Tabar L, Gad A:

Screening for breast cancer: the Swedish trial, *Radiology* 138:219-222, 1981.

1912 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Woolner LB, Fontant RS, Sanderson DR, et al:

Mayo Lung Project: evaluation of lung cancer screening through December 1979, *Mayo Clin Proc* 56:544-555, 1981.

1913 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Shapiro S:

Evidence on screening for breast cancer from a randomized trial, *Cancer* 39:2772-2782, 1977.

1914 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Statland BE:

Clinical decision levels for lab tests, Oradell, N.J., 1983, Medical Economics Co.

1915 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Rubin P:

Clinical oncology for medical students and physicians, ed 5, New York, 1978, American Cancer Society.

1916 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Winkel P, Bentzon MW, Statland BE, et al:

Predicting recurrence in patients with breast cancer from cumulative laboratory results: a new technique for the application of time series analysis, *Clin Chem* 28:2057-2067, 1982.

1917 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Ravry M, Moertel CG, Schutt AJ, et al:

Usefulness of serial serum carcinoembryonic antigen (CEA) determinations during anticancer therapy or long-term follow-up of gastrointestinal carcinoma, *Cancer* 34:1230-1234, 1974.

1918 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Chan DW:

PSA as a marker for prostatic cancer, *Clin Chem* 33:1916-1920, 1987.

1919 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Coombes RC, Neville AM:

Significance of tumor-index substances in management. In Stoll BA, editor: *Secondary spread in breast cancer*, Chicago, 1978, William Heinemann Medical Books.

1920 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Rej R, et al:

Clinical laboratory testing in cancer patient diagnosis and management, *Clin Chem* 39:2359-2452, 1993.

1921 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Rej R, et al:

Clinical laboratory testing in cancer patient diagnosis and management, *Clin Chem* 39:2359-2452, 1993.



Sell S, editor:

Serological cancer markers, Totowa, N.J., 1992, Humana Press.

1922 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Gold P, Freedman SO:

Demonstration of tumor-specific antigens in human colonic carcinomata by immunological tolerance and absorption techniques, *J Exp Med* 121:439-462, 1965.

1923 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

CEA as a cancer marker, vol 3, no 7, Bethesda, Md., 1981, National Institutes of Health, Consensus Development Conference Summary.

1924 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Holyoke ED, Chu TM, Murphy GP:

CEA as a monitor of gastrointestinal malignancy, *Cancer* 35:830-836, 1975.

1925 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Costanza ME, Das S, Nathanson L, et al:

Proceedings: carcinoembryonic antigen: report of a screening study, *Cancer* 33:583-590, 1974.

1926 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

McCartney WH, Hoffer PB:

The value of carcinoembryonic antigen (CEA) as an adjunct to the radiological colon examination in the diagnosis of malignancy, *Radiology* 110:325-328, 1974.

1927 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

CEA as a cancer marker, vol 3, no 7, Bethesda, Md., 1981, National Institutes of Health, Consensus Development Conference Summary.

1928 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Wanebo HJ, Rao B, Pinsky CM, et al:

Preoperative carcinoembryonic antigen level as a prognostic indicator in colorectal cancer, *N Engl J Med* 299:448-452, 1978.

1929 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Statland BE, Winkel P:

Usefulness of clinical chemistry measurements in classifying patients with breast cancer, *CRC Crit Rev Clin Lab Sci* 26:255-290, 1982.

1930 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Sell S, Becker FF:

Alpha-fetoprotein, *J Natl Cancer Inst* 60:19-26, 1978.

1931 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Vaitukaitis JL:

Secretion of human chorionic gonadotrophin by tumors. In Carcino-embryonic proteins, vol 1, New York, 1979, Elsevier/North Holland, pp 447-455.

1932 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Braunstein GD:

Human chorionic gonadotropin in nontrophoblastic tumors and tissues. In Talwar GP, editor: *Recent advances in reproduction and regulation of fertility*, Amsterdam, 1979, Elsevier/North Holland Biomedical Press.

1933 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Carter HB, Pearson JD, Metter EJ, et al:

Longitudinal evaluation of prostate specific antigen levels in men with and without prostate disease, *JAMA* 267:2215-2220, 1992.

1934 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Schwartz MK:

Enzyme tests in cancer. In Statland BE, Winkel P, editors: *Laboratory measurements in malignant disease*, Philadelphia, 1982, Saunders.

1935 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)



Chu TM, Wang MC, Scott WW, et al:

Immunological detection of serum prostatic acid phosphatase: methodology and clinical evaluation, *Invest Urol* 15:319-323, 1978.

1936 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Watson RA, Tang DB:

The predictive value of prostatic acid phosphatase as a screening test for prostatic cancer, *N Engl J Med* 303:497-499, 1980.

1937 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Reddi K, Holland JF:

Elevated serum ribonuclease in patients with pancreatic cancer, *Proc Natl Acad Sci* 73:2308, 1976.

1938 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Fitzgerald PJ, Fortner JG, Watson RC, et al:

The value of diagnostic aids in detecting pancreas cancer, *Cancer* 41:868- 879, 1979.

1939 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Lake-Bakaar G, McKavanaugh S, Summerfield JA:

Urinary immunoreactive trypsin excretion: a non-invasive screening test for pancreatic cancer, *Lancet* 2:878-880, 1979.

1940 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Ravry M, Moertel CG, Schutt AJ, et al:

Usefulness of serial serum carcinoembryonic antigen (CEA) determinations during anticancer therapy or long-term follow-up of gastrointestinal carcinoma, *Cancer* 34:1230-1234, 1974.

1941 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Carter HB, Pearson JD, Metter EJ, et al:

Longitudinal evaluation of prostate specific antigen levels in men with and without prostate disease, *JAMA* 267:2215-2220, 1992.

1942 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Pertschuk LP, Eisenberg KB, Carter AC, Feldmann JG:

Immunohistologic localization of estrogen receptors in breast cancer with monoclonal antibodies, *Cancer* 55:1513-1520, 1985.

1943 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Robinson DB, Glew RH:

Acid phosphatase in Gaucher's disease, *Clin Chem* 26:371-382, 1980.

1944 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Yam LT, Li CY, Finkel HE:

Leukemic reticuloendotheliosis: the role of tartrate-resistant acid phosphatase in the diagnosis and splenectomy in treatment, *Arch Intern Med* 130:248-256, 1972.

1945 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Deftos LJ, Glowacki J:

Mechanisms of bone metabolism. In Kem DC, Frohlich E, editors: *Pathophysiology*, ed 3, Philadelphia, 1984, Lippincott.

Lau KH, Onishi T, Wergedal JE, et al:

Characterization and assay of tartrate-resistant acid phosphatase activity in serum: potential use to assess bone resorption, *Clin Chem* 33:458-462, 1987.

1946 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Ewen LM:

Acid phosphatase activity (thymolphthalein monophosphate substrate). In Faulkner WH, Meites S, editors: *Selected methods for the small clinical laboratory*, Philadelphia, 1982, Saunders.

1947 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Townsend RM:

Enzyme tests in diseases of the prostate, *Ann Clin Lab Sci* 7:254-261, 1977.



1948 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Young DS:

Effects of drugs on clinical laboratory tests, Washington, D.C., 1990, American Association for Clinical Chemistry Press, pp 3-4 and 3-5.

1949 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Schiele F, Artur Y, Floch AY, Siest G:

Total, tartrate-resistant, and tartrate-inhibited acid phosphatase in serum: biological variations and reference limits, *Clin Chem* 34:685-690, 1988.

1950 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Berggard I, Bearn AG:

Isolation and properties of a low molecular weight β_2 -globulin occurring in human biological fluids, *J Biol Chem* 243:4095-4103, 1968.

1951 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, et al:

Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2, *Nature* 329:506-512, 1987.

1952 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Plesner T, Bjerrum OJ:

Distribution of "free" and HLA-associated human β_2 -microglobulin in some plasma membranes and biological fluids, *Scand J Immunol* 11:341-351, 1980.

Nilsson K, Ervin P-E, Welsh KI:

Production of β_2 -microglobulin by normal and malignant human cell lines and peripheral lymphocytes [Review], *Transplant Rev* 21:53-84, 1974.

1953 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Fuchs D, Hausen A, Reibnegger G, et al:

β_2 -Microglobulin and immune activation [Letter], *Clin Chem* 35:2158-2159, 1989.

1954 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Bhalla RB, Safai B, Pahwa S, Schwartz MK:

β_2 -Microglobulin as a prognostic marker for development of AIDS, *Clin Chem* 31:1411-1412, 1985.

Wibell L, Ervin PE, Berggard I:

Serum beta-2-microglobulin in renal disease, *Nephron* 10:320-331, 1973.

1955 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Durie BGM, Stock-Novack D, Salmon SE, et al:

Prognostic value of pretreatment serum β_2 microglobulin in myeloma: a Southwest Oncology Group study, *Blood* 75:823-830, 1990.

1956 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Tienhaara A, Eskola JU, Nanto:

Double monoclonal time-resolved immunofluorometric assay of β_2 -microglobulin in serum, *Clin Chem* 36:1961-1964, 1990.

1957 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Rifai N, Morales A:

Immunoturbidimetry of β_2 -microglobulin in serum, *Clin Chem* 35:1996-1997, 1989.

1958 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Desjarlais F, Daigneault R:

Limitations of conventional laser nephelometry for the measurement of β_2 -microglobulin, lysozyme, α_1 -fetoprotein and myoglobin in serum and urine, *Clin Biochem* 14:146-149, 1981.

1959 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Viedma JA, Pacheco S, Albaladejo MD:

Determination of β_2 -microglobulin in serum by a microparticle-enhanced nephelometric immunoassay, *Clin*



Chem 38:2464-2468, 1992.

1960 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Viedma JA, Pacheco S, Albaladejo MD:

Determination of β_2 -microglobulin in serum by a microparticle-enhanced nephelometric immunoassay, *Clin Chem* 38:2464-2468, 1992.

1961 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Ervin PE, Peterson PA, Wide L, Berggard I:

Radioimmunoassay of β_2 -microglobulin in human biological fluids, *Scand J Clin Lab Invest* 28:439-443, 1971.

1962 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Shuster J, Gold P, Poulik MO:

β_2 M levels in cancerous and other disease states, *Clin Chim Acta* 67:307-313, 1976.

1963 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Meillet D, Belec L, Schuller E, Delattre J:

Time-resolved fluoroimmunoassay of β_2 -microglobulin in serum and cerebrospinal fluid, *Clin Chem* 39:552-553, 1993.

1964 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Bjerrum OW, Birgens HS:

Measurement of beta-2-microglobulin in serum and plasma by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), *Clin Chim Acta* 155:69-76, 1986.

1965 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Swanson RA, Tracy RP, Katzman JA, et al:

β_2 -microglobulin determined by radioimmunoassay with monoclonal antibody, *Clin Chem* 28:2033-2039, 1982.

1966 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Bastable MD:

β_2 -microglobulin in urine: not suitable for assessing renal tubular function, *Clin Chem* 29:996-997, 1983.

1967 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Forman DT:

Serum beta-2-microglobulin as an indicator of neoplasia, *J Clin Immunoassay* 6:228-233, 1983.

1968 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Tienhaara A, Eskola JU, Nanto:

Double monoclonal time-resolved immunofluorometric assay of β_2 -microglobulin in serum, *Clin Chem* 36:1961-1964, 1990.

1969 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Rifai N, Morales A:

Immunoturbidimetry of β_2 -microglobulin in serum, *Clin Chem* 35:1996-1997, 1989.

1970 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Lutz CT, Cornell SH, Goeken JA:

Establishment of reference interval for β_2 -microglobulin in cerebrospinal fluid with use of two commercial assays, *Clin Chem* 37:104-107, 1991.

1971 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Forman DT, Finn W, Mandel S:

Comparison of an enzyme immunoassay for serum beta-2-microglobulin (β_2 M) with a radioimmunoassay technique, *Clin Chem* 29:1245, 1983.

1972 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Forman DT, Finn W, Mandel S:

Comparison of an enzyme immunoassay for serum beta-2-microglobulin (β_2 M) with a radioimmunoassay



technique, *Clin Chem* 29:1245, 1983.

1973 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Hammarstrom S, Shively JE, Paxton RJ, et al:

Antigenic sites is carcinoembryonic antigen, *Cancer Res* 49:4852-4858, 1989.

1974 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Bormer O:

Standardization, specificity, and diagnostic sensitivity of four immunoassays for carcinoembryonic antigen, *Clin Chem* 37(2):231-236, 1991.

1975 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Hansen H, Snyder J, Miller E, et al:

Carcinoembryonic antigen (CEA) assay: a laboratory adjunct in the diagnosis and management of cancer, *Hum Pathol* 5:139, 1974.

1976 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Rule A:

Carcinoembryonic antigens (CEA). In Kaplan LA, Pesce AJ, editors: *Clinical chemistry theory: analysis and correlation*, Philadelphia, 1989, Mosby.

1977 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Finley PR, Williams RJ, Lichti DA, et al:

Immunochemical determination of human immunoglobulins: use of kinetic turbidimetry and a 36-place centrifugal analyzer, *Clin Chem* 25:526-530, 1979.

1978 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Papsidero L, Kuriyama M, Wang M, et al:

Prostate antigen: a marker for human prostatic epithelial cells, *J Natl Cancer Inst* 66:37-41, 1981.

Iwakiri J, Grandbois K, Graves HCB, Stamey T:

An analysis of urinary prostate-specific antigen before and after radical prostatectomy: evidence for secretion of prostate-specific antigen by the periurethral glands, *J Urol* 149:783-786, 1993.

1979 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Vessella KL:

Trends in immunoassays of prostate-specific antigen: serum complexes and ultrasensitivity, *Clin Chem* 39(10):2035-2039, 1993.

1980 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Lange PH, Ercole CJ, Lightner DJ, et al:

The value of serum prostate-specific antigen determinations before and after radical prostatectomy, *J Urol* 141:873-879, 1989.

1981 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Vessella KL:

Trends in immunoassays of prostate-specific antigen: serum complexes and ultrasensitivity, *Clin Chem* 39(10):2035-2039, 1993.

1982 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Vessella KL:

Trends in immunoassays of prostate-specific antigen: serum complexes and ultrasensitivity, *Clin Chem* 39(10):2035-2039, 1993.

1983 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Oesterling JE:

Prostate specific antigen: a critical assessment of the most useful tumor marker for adenocarcinoma of the prostate, *J Urol* 145:907-923, 1991.

1984 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Armbruster DA:

Prostate-specific antigen: biochemistry, analytical methods, and clinical application, *Clin Chem*



39(2):181-195, 1993.

1985 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

White RW, Meyers FJ, Soares SE, et al:

Urinary prostate specific antigen levels: role in monitoring the response of prostate cancer to therapy, *J Urol* 147:947-951, 1992.

1986 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Killian CS, Chu TM:

Prostate-specific antigen: questions often asked, *Cancer Invest* 8:27-37, 1990.

1987 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Simm B, Gleeson M:

Storage conditions for serum for estimating prostate-specific antigen, *Clin Chem* 37:113-114, 1991.

van Dieijen-Visser MP, Delaere KPJ, Gijzen AHJ, Brombacher PJ:

A comparative study on the diagnostic value of prostatic acid phosphatase (PAP) and prostatic-specific antigen (PSA) in patients with carcinoma of the prostate gland, *Clin Chem Acta* 174:131-140, 1988.

1988 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Babaian R, Camps J:

The role of prostate-specific antigen as part of the diagnostic triad and as a guide when to perform a biopsy, *Cancer* 68:2060-2063, 1991.

1989 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Fritsche HA, Babaian RJ:

Analytical performance goals for measuring prostate-specific antigen, *Clin Chem* 39(7):1525-1529, 1993.

1990 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Ojala K, Weber TH:

Some alternatives to the proposed selected method for "agar gel electrophoresis," *Clin Chem* 26:1754-1755, 1980.

1991 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Harrison HH, Levitt MH, Bedford K:

Serum protein electrophoresis: basic principles, interpretations, practical considerations, and new techniques. ASCP Check Sample Core Analyte No. PTS93-8 (PTS-74), Chicago, American Society of Clinical Pathologists, pp 1-10.

1992 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Rosenfield L:

Serum protein electrophoresis: a comparison of the use of thin-layer agarose gel and cellulose acetate, *Am J Clin Pathol* 62:702-706, 1974.

Jeppsson JO, Laurell CB, Franzen B:

Agarose gel electrophoresis, *Clin Chem* 25:629-638, 1979.

1993 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Whicher JT, Spence CE:

Serum protein zone electrophoresis-an outmoded test? *Ann Clin Biochem* 24:133-139, 1987.

1994 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Whicher JT, Spence CE:

Serum protein zone electrophoresis-an outmoded test? *Ann Clin Biochem* 24:133-139, 1987.

1995 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Sinclair D, Kumeraratne DS, Forrester JB, et al:

The application of isoelectric focusing to routine screening for paraproteins, *J Immunol Methods* 64:147-156, 1983.

1996 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Harrison HH, Levitt MH, Bedford K:



Serum protein electrophoresis: basic principles, interpretations, practical considerations, and new techniques. ASCP Check Sample Core Analyte No. PTS93-8 (PTS-74), Chicago, American Society of Clinical Pathologists, pp 1-10.

1997 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Harrison HH, Miller KL, Dickinson C, Daufeldt JA:

Quality assurance and reproducibility of high-resolution two-dimensional electrophoresis and silver staining in polyacrylamide gels, *Am J Clin Pathol* 97:97-105, 1992.

Janson RW, Verstosick FT Jr, Kelly RH:

A method for recovery of active, clonally-restricted immunoglobulins from agarose gels, *Electrophoresis* 10:11-15, 1989.

1998 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Harrison HH, Levitt MH, Bedford K:

Serum protein electrophoresis: basic principles, interpretations, practical considerations, and new techniques. ASCP Check Sample Core Analyte No. PTS93-8 (PTS-74), Chicago, American Society of Clinical Pathologists, pp 1-10.

1999 (Ventana-emergente - Popup)

Dato aportado por la American Cancer Society.

2000 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Loomis TA:

Essentials of toxicology, ed 3, Philadelphia, 1978, Lea & Febiger.

2001 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Porter WH:

Chiral pharmacology; the left- and right-hand nature of drugs, *Therapeutic Drug Monitoring/Toxicology In-Service Training & Continuing Education* 11(1):7-115, 1989.

Wainer IW, Granvil CP:

Stereoselective separations of chiral anticancer drugs and their application to pharmacodynamic and pharmacokinetic studies, *Ther Drug Monit* 15:570-575, 1993.

2002 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Nebert DW, Nelson DR, Coon MJ, et al:

The P-450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, and recommended nomenclature, *DNA Cell Biol* 10:1-14, 1991.

2003 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Litovitz TL, Schmitz BF, Bailey KM:

1991 Annual report of the American Association of Poison Control Centers National Data Collection System, *Am J Emerg Med* 10:452-505, 1992.

2004 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Wong SHY:

Rational utilization of the toxicology laboratory, *Crit Care Rep* 2:295-306, 1991.

2005 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Merigian KS, Schroeder TJ, Tasset JJ, Pesce A:

Toxicology screening pattern in Hamilton County, Ohio: review of 1710 comprehensive drug screens in 5 area hospitals, *J Clin Lab Anal* 2:112-116, 1988.

2006 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Hanenson IB, editor:

Quick reference to clinical toxicology, Philadelphia, 1980, Lippincott.

2007 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Kulig K:



Initial management of ingestions of toxic substances, *N Engl J Med* 326:1677-1681, 1992.

2008 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Stockley I:

Drug interactions: a source book of adverse interactions, their clinical importance, mechanisms and management, ed 2, Oxford, 1991, Blackwell Scientific Publications.

2009 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Glynn JP, Kendal SE:

Paracetamol measurement, *Lancet* 1:1147-1148, 1975.

2010 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Howie D, Adriaenssens PI, Prescott LF:

Paracetamol metabolism following overdose: application of high performance liquid chromatography, *J Pharm Pharmacol* 29:235-237, 1977.

2011 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Armbruster DA, Schwarzhoff RH, Hubster EC, Liserio MK:

Enzyme immunoassay, kinetic microparticle immunoassay, radioimmunoassay, and fluorescence polarization immunoassay compared for drugs-of-abuse screening, *Clin Chem* 39(10):2137-2146, 1993.

2012 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Department of Health and Human Services: Mandatory guidelines for federal workplace drug testing programs: final guideline notice, *Fed Reg* 53:11969-11989, 1989.h

2013 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Armbruster DA, Schwarzhoff RH, Hubster EC, Liserio MK:

Enzyme immunoassay, kinetic microparticle immunoassay, radioimmunoassay, and fluorescence polarization immunoassay compared for drugs-of-abuse screening, *Clin Chem* 39(10):2137-2146, 1993.

2014 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Wu AHB, Wong SS, Johnson KG, et al:

Evaluation of the triage system for emergency drugs-of-abuse testing in urine, *J Anal Toxicol* 17:241, 1993.

2015 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Armbruster DA, Hubster EC, Kaufman MS, Ramon MK:

Cloned enzyme donor immunoassay (IDEC) for drugs-of-abuse screening, *Clin Chem* 41(1):92-98, 1995.

2016 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Blass KG:

A rapid simple thin-layer chromatography drug screening procedure, *J Chromatogr* 95:75-79, 1974.

2017 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Cholak J, Hubbard D, Burkey R:

Microdetermination of lead in biological material with dithizone at high pH, *Anal Chem* 20:671-672, 1948.

2018 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Kopito L, Schwachman H:

Measurement of lead in blood, urine and scalp hair by atomic absorption spectrometry, *Standard Methods Clin Chem* 7:151-162, 1972.

Yeager DW, Cholak J, Henderson EW:

Determination of lead in biological and related material by atomic absorption spectrophotometry, *Environ Sci Technol* 5:1020-1022, 1971.

2019 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Olsen ED, Jatlow PI:

An improved Delves cup atomic absorption procedure for determination of lead in blood and urine, *Clin Chem* 18:1312-1317, 1972.



2020 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Sunderman FW:

Electrothermal atomic absorption spectrometry of trace metals in biological fluids. In Forman DT, Matton RW, editors: *Clinical chemistry: ACS Symposium Series 36*, Washington, D.C., 1975, American Chemical Society.

2021 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Parsons PJ, Slavin W:

A rapid zeeman graphite furnace atomic absorption spectrometric method for the determination of lead in blood, *Spectrochimica Acta* 48B: 925-939, 1993.

2022 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Lead in blood, method no. P&CAM 195. In Taylor DG: *Manual coordination: NIOSH Manual of analytical methods*, ed 2, vol 1, Washington, D.C., 1977, US Government Printing Office, pp 195-1 to 195-7.

2023 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Meranger JC, Hollebone BR, Blanchette GA:

The effects of storage times, temperature and container types on the accuracy of atomic absorption determination of Cd, Cu, Hg, Pb, and Zn in whole heparinized blood, *J Anal Toxicol* 5:33-41, 1981.

2024 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Unger BC, Green VA:

Blood lead analysis: lead loss to storage containers, *Clin Toxicol* 11:237-243, 1977.

2025 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Critique: Blood lead analysis, 1981, document no. 34Q205158208, Atlanta, Ga., May 1982, Centers for Disease Control, US Department of Health and Human Services.

2026 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

"Criteria for a recommended standard. Occupational exposure to inorganic lead," revised criteria, NIOSH, DHEW Publ no 78-158, Washington, D.C., 1978, Superintendent of Documents, US Government Printing Office.

2027 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

"Criteria for a recommended standard. Occupational exposure to inorganic lead," revised criteria, NIOSH, DHEW Publ no 78-158, Washington, D.C., 1978, Superintendent of Documents, US Government Printing Office.

2028 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Airborne lead in perspective, Report of the Committee on Biological Effects of Atmosphere Pollutants of the National Research Council\National Academy of Sciences, Washington, D.C., 1972, Printing and Publishing Offices.

2029 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Airborne lead in perspective, Report of the Committee on Biological Effects of Atmosphere Pollutants of the National Research Council\National Academy of Sciences, Washington, D.C., 1972, Printing and Publishing Offices.

2030 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Airborne lead in perspective, Report of the Committee on Biological Effects of Atmospheric Pollutants of the National Research Council\National Academy of Sciences, Washington, D.C., 1972, Printing and Publishing Offices.

2031 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Brodie BB, Udenfriend S, Coburn AF:

The determination of salicylic acid in plasma, *J Pharmacol* 80:114-117, 1944.

2032 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Trinder P:

Rapid determination of salicylate in biological fluid, *Biochem J* 57:301-303, 1954.

2033 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Trinder P:



Rapid determination of salicylate in biological fluid, *Biochem J* 57:301-303, 1954.

2034 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Weichselbaum TE, Shapiro I:

A rapid and simple method for the determination of salicylic acid in small amounts in blood plasma, *Am J Clin Pathol* 9:42-44, 1945.

2035 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Rance ML, Jordan BI, Nichols JD:

A simultaneous determination of acetylsalicylic acid, salicylic acid, and salicylamide in plasma by gas-liquid chromatography, *J Pharm Pharmacol* 27:425-429, 1975.

2036 (Ventana-emergente - Popup)

National Institute on Drug Abuse: National household survey on drug abuse: main findings 1990, Rockville, Md., 1991, U.S. Department of Health and Human Services.

2037 (Ventana-emergente - Popup)

Johnson VE:

Intervention: how to help someone who doesn't want help, Minneapolis, 1986, Johnson Institute Books.

2038 (Ventana-emergente - Popup)

Goldsmith RJ, Warner A, Hassan FM: Substance abuse tes-ting, In-service Training and Continuing Education 11:7-13, 1989.

2039 (Ventana-emergente - Popup)

Meyer RE, Babor TF:

Explanatory models of alcoholism. In Tasman A, Hales RE, Frances AJ, editors: Review of psychiatry, vol. 8, Washington, D.C., 1989, American Psychiatric Press.

2040 (Ventana-emergente - Popup)

Meyer RE, Babor TF:

Explanatory models of alcoholism. In Tasman A, Hales RE, Frances AJ, editors: Review of psychiatry, vol. 8, Washington, D.C., 1989, American Psychiatric Press.

2041 (Ventana-emergente - Popup)

Goldsmith RJ.

An integrated psychology for the addictions: beyond the self-medication hypothesis, *J Addict Dis* 12:137-152, 1993.

2042 (Ventana-emergente - Popup)

National Institute on Drug Abuse:

National household survey on drug abuse: main findings 1990, Rockville, Md., 1991, U.S. Department of Health and Human Services.

2043 (Ventana-emergente - Popup)

Yamaguchi K, Kandel DB:

Patterns of drug use from adolescence to young adulthood: II. Sequences of progression, *Am J Public Health* 74:668-672, 1984.

2044 (Ventana-emergente - Popup)

Weiss KJ, Greenfield DP: Prescription drug abuse, *Psychiatr Clin North Am* 9:475-490, 1986.

2045 (Ventana-emergente - Popup)

Chan AWK:

Multiple drug use in drug and alcohol addiction. In Miller NS, editor: Comprehensive



handbook of drug and alcohol addiction, New York, 1991, Marcel Dekker.

2046 (Ventana-emergente - Popup)

Benzer DG:

Medical consequences of alcohol addiction. In Miller NS, editor: Comprehensive handbook of drug and alcohol addiction, New York, 1991, Marcel Dekker.

2047 (Ventana-emergente - Popup)

Benzer DG:

Medical consequences of alcohol addiction. In Miller NS, editor: Comprehensive handbook of drug and alcohol addiction, New York, 1991, Marcel Dekker.

Engel CJ, Benzer DG:

Medical complications of drug addiction. In Miller NS, editor: Comprehensive handbook of drug and alcohol addiction, New York, 1991, Marcel Dekker.

Geller A:

Neurological effects of drug and alcohol addiction. In Miller NS, editor: Comprehensive handbook of drug and alcohol addiction, New York, 1991, Marcel Dekker.

2048 (Ventana-emergente - Popup)

Engel CJ, Benzer DG:

Medical complications of drug addiction. In Miller NS, editor: Comprehensive handbook of drug and alcohol addiction, New York, 1991, Marcel Dekker.

2049 (Ventana-emergente - Popup)

Regier DA, Farmer ME, Rae DS, et al: Comorbidity of mental disorders with alcohol and other drug abuse, JAMA 264:2511-2518, 1990.

2050 (Ventana-emergente - Popup)

Schuckit MA:

Biological vulnerability to alcoholism. In Miller NS, editor: Comprehensive handbook of drug and alcohol addiction, New York, 1991, Marcel Dekker.

2051 (Ventana-emergente - Popup)

Goldsmith RJ, Warner A, Hassan FM: Substance abuse tes-ting, In-service Training and Continuing Education 11:7-13, 1989.

2052 (Ventana-emergente - Popup)

Tiebout H:

The problem of gaining cooperation from the alcoholic patient. Q J Study Alcohol 8:47-54, 1947-1948.

2053 (Ventana-emergente - Popup)

Engelhart P, Robinson H, Carpenter HD:

The workplace. In Lowinson JH, Ruiz P, Millman RB, Langrod JG, editors: Substance abuse: a comprehensive textbook, Baltimore, 1992, Williams & Wilkins.

2054 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Wilkinson JH:

Principles and practice of diagnostic enzymology, London, 1976, EJ Arnold & Son.

2055 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Moss DW:

2721



Isoenzyme analysis, London, 1979, The Chemical Society.

2056 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Markert CL:

The molecular basis for isoenzymes, *Ann NY Acad Sci* 151:15-39, 1968.

2057 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Harris H:

The human alkaline phosphatases: what we know and what we don't know, *Clin Chim Acta* 186:133-150, 1989.

2058 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Moss DW:

Perspectives in alkaline phosphatase research, *Clin Chem* 38:2486-2492, 1992.

2059 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Rothe GM:

A survey of the formation and localization of secondary isoenzymes in mammalia, *Hum Genet* 56:129-155, 1980.

2060 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Panteghini M:

Serum isoforms of creatine kinase isoenzymes, *Clin Biochem* 21:211-218, 1988.

Wu ABW:

Creatine kinase isoforms in ischemic heart disease, *Clin Chem* 35:7-13, 1989.

2061 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Rothe GM:

A survey of the formation and localization of secondary isoenzymes in mammalia, *Hum Genet* 56:129-155, 1980.

2062 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Rothe GM:

A survey of the formation and localization of secondary isoenzymes in mammalia, *Hum Genet* 56:129-155, 1980.

2063 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Moss DW:

Alkaline phosphatase isoenzymes, *Clin Chem* 28:2007-2016, 1982.

2064 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Moss DW, Whitaker KB:

Modification of alkaline phosphatases by treatment with glycosidases, *Enzyme* 34:212-216, 1985.

2065 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Panteghini M:

Serum isoforms of creatine kinase isoenzymes, *Clin Biochem* 21:211-218, 1988.

Wu ABW:

Creatine kinase isoforms in ischemic heart disease, *Clin Chem* 35:7-13, 1989.

2066 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Perryman MB, Knell JD, Roberts R:

Carboxypeptidase-catalyzed hydrolysis of C-terminal lysine: mechanism for in vivo production of multiple forms of creatine kinase in plasma, *Clin Chem* 30:662-664, 1984.

2067 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Panteghini M:

Serum isoforms of creatine kinase isoenzymes, *Clin Biochem* 21:211-218, 1988.

Wu ABW:

Creatine kinase isoforms in ischemic heart disease, *Clin Chem* 35:7-13, 1989.



2068 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Perryman MB, Knell JD, Roberts R:

Carboxypeptidase-catalyzed hydrolysis of C-terminal lysine: mechanism for in vivo production of multiple forms of creatine kinase in plasma, *Clin Chem* 30:662-664, 1984.

2069 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Fishman WH:

Alkaline phosphatase isoenzymes: recent progress, *Clin Biochem* 23:99-104, 1990.

2070 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Harris H:

The human alkaline phosphatases: what we know and what we don't know, *Clin Chim Acta* 186:133-150, 1989.

2071 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Russell RGG:

Excretion of inorganic pyrophosphate in hypophosphatasia, *Lancet* 2:461-464, 1965.

2072 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Russell RGG:

Excretion of inorganic pyrophosphate in hypophosphatasia, *Lancet* 2:461-464, 1965.

2073 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Cahn RD, Kaplan NO, Levine L, Zwilling E:

Nature and development of lactic dehydrogenases, *Science* 136:962-969, 1962.

2074 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Behrens CM, Enns CA, Sussman HH:

Characterization of human foetal intestinal alkaline phosphatase: comparison with the isoenzymes from the adult intestine and human tumor cell lines, *Biochem J* 211:553-558, 1983.

2075 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Wilhelm A:

Topochemical variation of LDH and CK isoenzyme patterns in aorta, *Artery* 8:362-367, 1980.

2076 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Pfleiderer G et al:

Tissue enzymes in phylogenetic and ontogenetic development. In Schmidt E et al, editors: *Advances in clinical enzymology*, Hannover, West Germany, 1979, S Karger AG.

2077 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Verpooten GF, Nouwen EJ, Hoylaerts MF, et al:

Segment specific localization of intestinal-type alkaline phosphatase in human kidney, *Kidney Int* 36:617-625, 1989.

2078 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Bowers GN, McComb RB, Statland BE, et al:

Measurement of total alkaline phosphatase activity in human serum (selected method), *Clin Chem* 21:1988-1995, 1975.

2079 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Wilhelm A:

Topochemical variation of LDH and CK isoenzyme patterns in aorta, *Artery* 8:362-367, 1980.

2080 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Wilhelm A:

Topochemical variation of LDH and CK isoenzyme patterns in aorta, *Artery* 8:362-367, 1980.

2081 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Lang H, Wurzburg U:

Creatine kinase, an enzyme of many forms, *Clin Chem* 28:1439-1447, 1982.



2082 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Lang H, Wurzburg U:

Creatine kinase, an enzyme of many forms, *Clin Chem* 28:1439-1447, 1982.

2083 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Schapira F:

Isoenzymes and cancer, *Adv Cancer Res* 18:77-153, 1973.

2084 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Raymond F, Datta H, Moss D:

Alkaline phosphatase isoforms in bile and serum and their generation from cells in vitro, *Biochim Biophys Acta* 1074:217-222, 1991.

2085 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Adams JE, Sicard GA, Allen BT, et al:

Diagnosis of perioperative myocardial infarction with measurement of cardiac troponin I, *N Engl J Med* 330:670-674, 1994.

Mair J, Dienstl F, Puschendorf B:

Cardiac troponin T in the diagnosis of myocardial injury, *Crit Rev Clin Sci* 29:31-57, 1992.

2086 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Panteghini M:

Serum isoforms of creatine kinase isoenzymes, *Clin Biochem* 21:211-218, 1988.

Wu ABW:

Creatine kinase isoforms in ischemic heart disease, *Clin Chem* 35:7-13, 1989.

Christenson RH, Ohman EM, Clemmenson P, et al:

Characteristics of creatine kinase-MB and the MB isoforms in serum after reperfusion in acute myocardial infarction, *Clin Chem* 35:2179-2185, 1989.

2087 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Kaddam IM, Iqbal SJ, Holland S, et al:

Comparison of serum osteocalcin with total and bone specific alkaline phosphatase and urinary hydroxyproline:creatinine ratio in patients with Paget's disease of bone, *Ann Clin Biochem* 31:327-330, 1994.

Garnero P, Delmas PD:

Assessment of serum levels of bone alkaline phosphatase with a new immunoradiometric assay in patients with metabolic bone disease, *J Clin Endocrinol Metab* 77:1046-1053, 1993.

2088 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Christenson RH:

Specificity of an immunochemical reagent for quantifying the isoforms of creatine kinase-MB, *J Clin Lab Anal* 7:220-224, 1993.

Panteghini M, Bonora R, Pagani F, Alebardi O:

An immunochemical procedure for determination of creatine kinase 3₁ (serum-specific) isoform in human serum evaluated, *Clin Biochem* 23:225-228, 1990.

2089 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Ritschel WA:

Handbook of basic pharmacokinetics including clinical applications, Hamilton, Ill., 1986, Drug Intelligence Publications.

2090 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Borga O, Azarnoff DL, Plym Forshell G, Sj`qvist F:

Plasma protein binding of tricyclic antidepressants in man, *Biochem Pharmacol* 18:2135-2143, 1969.

2091 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)



Reidenberg MM, Odar-Cederlof I, von Bahr C, et al:

Protein binding from diphenylhydantoin and desmethylinipramine in plasma from patients with poor renal function, *N Engl J Med* 285:264-267, 1971.

Levy G:

Relationship between pharmacological effects and plasma or tissue concentrations of drugs in man. In Davies DS, Pritchard DNC, editors: *Biological effects of drugs in relation to their plasma concentrations*, Baltimore, 1973, University Park Press.

2092 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Stewart RB, Forgnone M, Cluff LE:

Drug utilization and reported adverse drug reactions in outpatients, *Drugs in Health Care* 2:231-243, 1975.

2093 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Ritschel WA:

Pharmacokinetics of H₂-receptor antagonists, *Sci Pharm* 50:250-259, 1982.

2094 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Barker KN, McConnell WE:

How to detect medication errors, *Mod Hosp* 99:95-106, 1962.

2095 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Stewart RB, Cluff LE:

A review of medication errors and compliance in ambulant patients, *Clin Pharmacol Ther* 13:463-468, 1971.

2096 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Stewart RB, Cluff LE:

A review of medication errors and compliance in ambulant patients, *Clin Pharmacol Ther* 13:463-468, 1971.

2097 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Ritschel WA:

The effect of aging on pharmacokinetics: a scientists' view of the future, *Contemp Pharmacy Pract* 5:209-218, 1982.

2098 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Hassan FM, Pesce AJ, Ritschel WA:

Pitfalls and errors in drug monitoring: analytical aspects, *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 5:567-573, 1983.

2099 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Slaughter RL, Koup JR:

Clinical pharmacokinetic service. In McLeod DD, Miller WA, editors: *The practice of pharmacy*, Cincinnati, 1981, Harvey Whitney Books.

2100 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Holt DW, Johnston A, Roberts NB, et al:

Methodological and clinical aspects of cyclosporin monitoring: report of the Association of Clinical Biochemists task force, *Ann Clin Biochem*, 31:420-446, 1994.

Oellerich M, Armstrong VW, Kahan BD, Shaw L, Holt DW, Yatscoff R, Lindholm A, Halloran P, Gallicano K. Wonigeit K, Schhtz E, Schran H, Annesley T:

Lake Louise Consensus Conference on Cyclosporin Monitoring in Organ Transplantation: Report of the Consensus Panel, *Ther Drug Monit*, 1995. (In press.)

2101 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Oellerich M, Armstrong VW, Kahan BD, Shaw L, Holt DW, Yatscoff R, Lindholm A, Halloran P, Gallicano K. Wonigeit K, Schhtz E, Schran H, Annesley T:

Lake Louise Consensus Conference on Cyclosporin Monitoring in Organ Transplantation: Report of the Consensus Panel, *Ther Drug Monit*, 1995. (In press.)

2102 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Matzuk MM, Shlomchik M, Shaw LM:

Making digoxin therapeutic drug monitoring more effective, *Ther Drug Monit* 13:215-219, 1991.



2103 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Edson RS, Terrell CL:

The aminoglycosides, *Mayo Clin Proc* 66:1158-1164, 1991.

2104 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Barclay ML, Begg EJ, Hickling KG:

What is the evidence for once-daily aminoglycoside therapy? *Clin Pharmacokinet* 27:32-48, 1994.

2105 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Blaser J, Konig C, Simmen HP, Thurnheer U:

Monitoring serum concentrations for once-daily netilmicin dosing regimens, *J Antimicrob Chemother* 33:341-348, 1994.

2106 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Sawchuk RJ, Zaske DE, Cipolle RJ, et al:

Kinetic model for gentamicin dosing with the use of individual patient parameters, *Clin Pharmacol Therap* 21:362-369, 1977.

2107 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Sheiner LB, Rosenberg B, Melmon K:

Modelling of individual pharmacokinetics for computer-aided dosage, *Computer Biomed Res* 5:441-459, 1972.

2108 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Yuen GJ, Taylor JW, Ludden TM, Murphy MJ:

Predicting phenytoin dosage using Bayesian feedback: a comparison with other methods, *Ther Drug Monit* 5:437-441, 1983.

Böttger H-Ch, Oellerich M, Sybrecht GW:

Use of aminoglycosides in critically ill patients: individualisation of dosage using Bayesian statistics and pharmacokinetic principles, *Ther Drug Monit* 10:280-286, 1988.

Hurley SF, McNeil JJ:

A comparison of the accuracy of a least squares regression, a Bayesian, Chiou's and the steady-state clearance method of individualising theophylline dosage, *Clin Pharmacokinet* 14:311-320, 1988.

Pryka RD, Rodvold KA, Garrison M, Rotschafer JC:

Individualizing vancomycin dosage regimens: one- versus two-compartment Bayesian models, *Ther Drug Monit* 11:450-454, 1989.

2109 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Destache CJ, Meyer SK, Bittner MJ, Mermann KG:

Impact of a clinical pharmacokinetic service on patients treated with aminoglycosides: a cost-benefit analysis, *Ther Drug Monit* 12:419-426, 1990.

Destache CJ, Meyer SK, Rowley KM:

Does accepting pharmacokinetic recommendations impact hospitalization? A cost-benefit analysis, *Ther Drug Monit* 12:427-433, 1990.

2110 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Holt DW, Johnston A, Roberts NB, et al:

Methodological and clinical aspects of cyclosporin monitoring: report of the Association of Clinical Biochemists task force, *Ann Clin Biochem*, 31:420-446, 1994.

Oellerich M, Armstrong VW, Kahan BD, Shaw L, Holt DW, Yatscoff R, Lindholm A, Halloran P, Gallicano K. Wonigeit K, Schhtz E, Schran H, Annesley T:

Lake Louise Consensus Conference on Cyclosporin Monitoring in Organ Transplantation: Report of the Consensus Panel, *Ther Drug Monit*, 1995. (In press.)

Bennet MJ, Carpenter KH, Worthy E, Lilleyman JS:

Cyclosporin concentrations in whole blood and plasma, *Clin Chem* 30:817, 1984.



2111 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Oellerich M, Armstrong VW, Kahan BD, Shaw L, Holt DW, Yatscoff R, Lindholm A, Halloran P, Gallicano K, Wonigeit K, Schltz E, Schran H, Annesley T:

Lake Louise Consensus Conference on Cyclosporin Monitoring in Organ Transplantation: Report of the Consensus Panel, *Ther Drug Monit*, 1995. (In press.)

2112 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Fraser CG:

Desirable standards of performance for therapeutic drug monitoring, *Clin Chem* 33:387-389, 1987.

2113 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Jenny RW:

Analytical goals for determinations of theophylline concentration in serum, *Clin Chem* 37:154-158, 1991.

2114 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Oellerich M, Raude E, Burdelski M, et al:

Monoethylglycinexylidide formation kinetics: a novel approach to assessment of liver function. *J Clin Chem Clin Biochem* 25:845-853, 1987.

2115 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Oellerich M, Burdelski M, Ringe B, et al:

Lignocaine metabolite formation as a measure of pre-transplant liver function, *Lancet* 1:640-642, 1989.

Adam R, Azoulay D, Astarcioglu I, et al:

Reliability of the MEGX test in the selection of liver grafts, *Transplant Proc* 23:2470-2471, 1991.

Oellerich M, Burdelski M, Lautz HU, et al:

Predictors of one-year pretransplant survival in patients with cirrhosis, *Hepatology* 14:1029-1034, 1991.

2116 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Gremse DA, A-Kader HH, Schroeder TJ, Balisteri WF:

Assessment of lidocaine metabolite formation as a quantitative liver function test in children, *Hepatology* 12:565-569, 1990.

2117 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Schroeder TJ, Gremse DA, Mansour ME, et al:

Lidocaine metabolism as an index of liver function in hepatic transplant donors and recipients, *Transplant Proc* 21:2299-2301, 1989.

Lehmann U, Armstrong VW, Schltz E, et al:

Monoethylglycinexylidide as an early predictor of posttraumatic organ failure, *Ther Drug Monit* 17:125-132, 1995.

2118 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Oellerich M, Mhller-Vahl H:

The EMIT FreeLevel ultrafiltration technique compared with equilibrium dialysis and ultracentrifugation to determine protein binding of phenytoin, *Clin Pharmacokinet* 9(suppl 1):61-70, 1984.

Zielmann S, Mielck F, Kahl R, et al:

A rational basis for the measurement of free phenytoin concentration in critically ill trauma patients, *Ther Drug Monit* 16:139-144, 1994.

2119 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Williams KM:

Molecular asymmetry and its pharmacological consequences, *Adv Pharmacol* 22:57-122, 1991.

2120 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Svensmark O, Kristensen P:

Determination of diphenylhydantoin and phenobarbital in small amounts of serum, *J Lab Clin Med*



61:501-507, 1963.

2121 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Pippenger CE, Scott JE, Gillen HW:

Thin-layer chromatography of anticonvulsant drugs, *Clin Chem* 15:255-260, 1969.

2122 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Rambeck B, Meijer JWA:

Gas chromatographic methods for the determination of antiepileptic drugs: a systematic review, *Ther Drug Monit* 2:385-396, 1980.

2123 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Rambeck B, Meijer JWA:

Gas chromatographic methods for the determination of antiepileptic drugs: a systematic review, *Ther Drug Monit* 2:385-396, 1980.

2124 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Volmut J, Matisova E, Pham Thi Ha:

Simultaneous determination of six antiepileptic drugs by capillary gas chromatography, *J Chromatogr* 547:428-435, 1990.

2125 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Meatherall R, Ford D:

Isocratic liquid chromatographic determination of theophylline, acetaminophen, chloramphenicol, caffeine, anticonvulsants, and barbiturates in serum, *Ther Drug Monit* 10:101-115, 1988.

Ou CN, Rognerud CL:

Simultaneous measurement of ethosuximide, primidone, phenobarbital, phenytoin, carbamazepine, and their bioactive metabolites by liquid chromatography, *Clin Chem* 30:1667-1670, 1984.

2126 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Price CP, Newman DJ, editors:

Radial partition immunoassay. In *Principles and practice of immunoassay*, New York, 1991, Stockton Press.

2127 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Frings CS, Phillips G:

Therapeutic drug monitoring of anticonvulsant drugs using fluorescence polarization immunoassay, *Clin Chem* 28:1611, 1982.

2128 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Tybach R:

Adaptation of prosthetic-group label homogeneous immunoassay to reagent strip format, *Clin Chem* 27:1499-1504, 1981.

2129 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Nishikawa T, Kubo H, Saito M:

Competitive nephelometric immunoassay method for antiepileptic drugs in patient blood, *J Immunol Methods* 29:85-89, 1979.

2130 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Engel WD, Khanna PL:

CEDIA in vitro diagnostics with a novel homogeneous immunoassay technique, *J Immunol Methods* 150:99-102, 1992.

2131 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Jandreski MA, Shah JC, Gardincius J, Bermes EW Jr:

Clinical evaluation of five therapeutic drugs using dry film multilayer technology on the OPUS immunoassay system, *J Clin Lab Anal* 5:415-421, 1991.

2132 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Blick KE, Melouk SH, Fry HD, Gillum RL:

Clin Chem 36:670-674, 1990.



2133 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Oellerich M, Armstrong VW, Kahan BD, Shaw L, Holt DW, Yatscoff R, Lindholm A, Halloran P, Gallicano K. Wonigeit K, Schltz E, Schran H, Annesley T:

Lake Louise Consensus Conference on Cyclosporin Monitoring in Organ Transplantation: Report of the Consensus Panel, *Ther Drug Monit*, 1995. (In press.)

2134 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Tredger JM, Gonde CE, Williams R:

Monitoring cyclosporine in liver-transplant recipients: effects of clinical status on the performance of two monoclonal antibody-based methods, *Clin Chem* 38:108-113, 1992.

2135 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Chou D:

Therapeutic drug monitoring (immunosuppressive drugs), *Anal Chem* 65:412R-415R, 1993.

2136 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Yatscoff RW, Copeland KR, Faraci CJ:

Abbott TDx monoclonal antibody assay evaluated for measuring cyclosporin in whole blood, *Clin Chem* 36:1969-1973, 1990.

2137 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Oellerich M, Armstrong VW, Kahan BD, Shaw L, Holt DW, Yatscoff R, Lindholm A, Halloran P, Gallicano K. Wonigeit K, Schltz E, Schran H, Annesley T:

Lake Louise Consensus Conference on Cyclosporin Monitoring in Organ Transplantation: Report of the Consensus Panel, *Ther Drug Monit*, 1995. (In press.)

Sketris I, Yatscoff R, Keown P, et al:

Optimizing the use of cyclosporin in renal transplantation, *Clin Biochem* 28:195-211, 1995.

2138 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Meatherall R, Ford D:

Isocratic liquid chromatographic determination of theophylline, acetaminophen, chloramphenicol, caffeine, anticonvulsants, and barbiturates in serum, *Ther Drug Monit* 10:101-115, 1988.

2139 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Oellerich M, Armstrong VW, Kahan BD, Shaw L, Holt DW, Yatscoff R, Lindholm A, Halloran P, Gallicano K. Wonigeit K, Schltz E, Schran H, Annesley T:

Lake Louise Consensus Conference on Cyclosporin Monitoring in Organ Transplantation: Report of the Consensus Panel, *Ther Drug Monit*, 1995. (In press.)

Sketris I, Yatscoff R, Keown P, et al:

Optimizing the use of cyclosporin in renal transplantation, *Clin Biochem* 28:195-211, 1995.

2140 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Sketris I, Yatscoff R, Keown P, et al:

Optimizing the use of cyclosporin in renal transplantation, *Clin Biochem* 28:195-211, 1995.

2141 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Shaw LM, Bowers L, Demers L, et al:

Critical issues in cyclosporine monitoring: report of the task force on cyclosporine monitoring, *Clin Chem* 33:1269-1288, 1987.

2142 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Lewis JE, Nelson JC, Wilson TN:

Radioimmunoassay of an antibiotic: gentamicin, *Nature (New Biol)* 239:214, 1972.

2143 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Fraser CG:

Desirable standards of performance for therapeutic drug monitoring, *Clin Chem* 33:387-389, 1987.

2144 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Barker KN, McConnell WE:



How to detect medication errors, *Mod Hosp* 99:95-106, 1962.

Stewart RB, Cluff LE:

A review of medication errors and compliance in ambulant patients, *Clin Pharmacol Ther* 13:463-468, 1971.

2145 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Okorodudu AO, Burnett RW, McComb RB, Bowers GN Jr:

Evaluation of three first-generation ion-selective electrode analyzers for lithium: systematic errors, frequency of random interferences, and recommendations based on comparison with flame atomic emission spectrometry, *Clin Chem* 36:104-110, 1990.

2146 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Hansen JL:

The measurement of serum and urine lithium by atomic absorption spectrophotometry, *Am J Med Tech* 34:19, 1968.

2147 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Blick KE, Melouk SH, Fry HD, Gillum RL:

Clin Chem 36:670-674, 1990.

2148 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Bertholf RL, Savory MG, Winborne KH, et al:

Lithium determined in serum with an ion-selective electrode, *Clin Chem* 34:1500-1502, 1988.

2149 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Bodman V, Arter T, Masiewicz F, et al:

Development of the Kodak Ektachem clinical chemistry slide for lithium (Li), *Clin Chem* 38:1049, 1992 [Abstract].

2150 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Brzezicki J, Muirhead C, Schmitz J, et al:

Acceptable anticoagulants for analysis of calcium and lithium on Beckman's Synchron EL-ISE system, *Clin Chem* 38:1023, 1992 [Abstract].

2151 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Platman SR, Fieve RR:

Biochemical aspects of lithium in affective disorders, *Arch Gen Psychiatry* 19:659-663, 1968.

2152 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Rybakowski J, Strzyzewski W:

Red-blood-cell lithium index and long-term maintenance treatment, *Lancet* 1:1408-1409, 1976 [Letter].

2153 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Rybakowski J, Strzyzewski W:

Red-blood-cell lithium index and long-term maintenance treatment, *Lancet* 1:1408-1409, 1976 [Letter].

2154 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Rainbow SJ, Dowson GM, Tickner TR:

Non-extraction HPLC method for simultaneous measurement of theophylline and caffeine in human serum, *Ann Clin Biochem* 26:527-532, 1989.

2155 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Orcutt JJ, Kozak PP, Sherwin AG, Cummins LH:

Microscale method for theophylline in body fluids by reversed phase high performance liquid chromatography of theophylline in serum, *Clin Chem* 23:599, 1977.

2156 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Desage M, Soubeyrand J, Soum A, Brazier JL:

Automated theophylline assay using gas chromatographic and a mass-selective detector, *J Chromatogr* 336:285-291, 1984.

2157 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Soldin SJ, Hill JG:

A rapid micromethod for measuring theophylline and reversed phase high pressure liquid chromatography, 2730



Clin Biochem 10:74, 1977.

2158 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Orcutt JJ, Kozak PP, Sherwin AG, Cummins LH:

Microscale method for theophylline in body fluids by reversed phase high performance liquid chromatography of theophylline in serum, *Clin Chem* 23:599, 1977.

Soldin SJ, Hill JG:

A rapid micromethod for measuring theophylline and reversed phase high pressure liquid chromatography, *Clin Biochem* 10:74, 1977.

2159 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Desage M, Soubeyrand J, Soun A, Brazier JL:

Automated theophylline assay using gas chromatographic and a mass-selective detector, *J Chromatogr* 336:285-291, 1984.

2160 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Loomi KF, Frye RM:

Evaluation of the Abbott TDM™ for the stat measurement of phenobarbital, phenytoin, carbamazepine, and theophylline, *Am J Clin Pathol* 80:686-691, 1983.

2161 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Klein G, Castineiras J, Collinsworth W, et al:

Results of multicenter evaluation of the CEDIA® theophylline line assay, *Wien Klin Wochenschr* 104:31-37, 1992.

2162 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Henderson DR, Friedman SB, Harris JD, et al:

CEDIA®, a new homogeneous immunoassay system, *Clin Chem* 32:1637-1641, 1986.

2163 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Chan K, Koenig J, Walton KG, et al:

The theophylline method of the Abbott "vision" analyzer evaluated, *Clin Chem* 33:130-132, 1987.

2164 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Mordelet-Dambrine M, Baglin J, Roux A, et al:

Comparison between theophylline analysis by nephelometric inhibition immunoassay and high performance liquid chromatography, *Ther Drug Monit* 8:106-110, 1986.

2165 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Lindberg R, Ivaska K, Irjala K, Vanto T:

Determination of theophylline in serum with the Seralyzer® Aris reagent strip test evaluated, *Clin Chem* 32:613-614, 1985.

2166 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Sood S, Green VI, Nieva LL:

Routine methods in toxicology and therapeutic drug monitoring by high-performance liquid chromatography. VI: A rapid microscale method for determination of caffeine in plasma and saliva, *Ther Drug Monit* 11:361-364, 1989.

Niemann A, Oellerich M, Schumann G, Sybrecht GW:

Determination of theophylline in saliva, using fluorescence polarization immunoassay (FPIA), *J Clin Chem Clin Biochem* 23:725-732, 1985.

2167 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Jenne JW, Wyze E, Rood FS, McDonald FM:

Pharmacokinetics of theophylline: application to adjustment of the clinical dose of aminophylline, *Clin Pharmacol Ther* 13:349-360, 1972.

Giacchia G, Jusko WJ, Menke J, Koup JR:

Theophylline pharmacokinetics in premature infants with apnea, *J Pediatr* 89:829-832, 1976.



Aranda JV, Turmen T, Trippenbach T, et al:

Effects of caffeine on control of breathing in infantile apnea, *J Pediatr* 103:975-978, 1983.

Rall TW:

Drugs used in the treatment of asthma: the methyl-xanthines, cromolyn sodium, and other agents. In Gilman AG, Rall TW, Nies AS, Taylor P, editors: *The Pharmacological basis of therapeutics*, ed 8, New York, 1990, Pergamon Press.

Bergmeyer HU:

Methods of enzymatic analysis, vol. XII, drugs and pesticides, Weinheim, III, 1986, VCH Publishers.

2168 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Giacoaia G, Jusko WJ, Menke J, Koup JR:

Theophylline pharmacokinetics in premature infants with apnea, *J Pediatr* 89:829-832, 1976.

Aranda JV, Turmen T, Trippenbach T, et al:

Effects of caffeine on control of breathing in infantile apnea, *J Pediatr* 103:975-978, 1983.

2169 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Rall TW:

Drugs used in the treatment of asthma: the methyl-xanthines, cromolyn sodium, and other agents. In Gilman AG, Rall TW, Nies AS, Taylor P, editors: *The Pharmacological basis of therapeutics*, ed 8, New York, 1990, Pergamon Press.

Bergmeyer HU:

Methods of enzymatic analysis, vol. XII, drugs and pesticides, Weinheim, III, 1986, VCH Publishers.

2170 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Bonnardeau A, Sommerville P, Kaye M:

A study on the reliability of dipstick urinalysis, *Clin Nephrol* 41:167-172, 1994.

Kennedy TJ, McConnell JD, Thall ER:

Urine dipstick vs. microscopic urinalysis in the evaluation of abdominal trauma, *J Trauma* 28:615-617, 1988.

2171 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Free AH, Free MA:

Rapid convenience urine tests: their use and misuse, *Lab Med* 9:9-17, 1978.

2172 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Schumann GB:

Urine sediment examination, Baltimore, 1980, Williams & Wilkins.

Fairley KF, Birch DF:

Microscopic urinalysis in glomerulonephritis, *Kidney Int* 44:9-12, 1993.

2173 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Eggensberger DL, King C, Gaudette LE, et al:

Cytodiagnostic urinalysis: three year experience with a new laboratory test, *Am J Clin Pathol* 91:202-206, 1989.

Marcussen N, Schumann JL, Schumann GB, et al:

Analysis of cytodiagnostic urinalysis findings in 77 patients with concurrent renal biopsies, *Am J Kidney Dis* 20:618-628, 1992.

Schumann GB, Schumann JL, Marcussen N:

Cytodiagnostic urinalysis of renal and lower urinary tract disorders, New York, 1995, Igaku-Shoin.

2174 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Schumann GB, Schumann JL, Marcussen N:

Cytodiagnostic urinalysis of renal and lower urinary tract disorders, New York, 1995, Igaku-Shoin.

2175 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)



Bradley M, Schumann GB, Ward PCJ:

Examination of urine. In Henry JB, editor: Todd-Sanford *clinical diagnosis by laboratory methods*, ed 16, Philadelphia, 1979, Saunders.

Tentative Committee for Clinical Laboratory Standards:

Routine urinalysis and collection, transportation and preservation of urine specimen, Villanova, Penna., 1992, 12(26) GP16-T.

2176 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Kunin CM:

Detection, prevention and management of urinary tract infections, ed 2, Philadelphia, 1974, Lea & Febiger.

2177 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Free AH, Free MA:

Rapid convenience urine tests: their use and misuse, *Lab Med* 9:9-17, 1978.

2178 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Bradley M, Schumann GB, Ward PCJ: Examination of urine. In Henry JB, editor: Todd-Sanford *clinical diagnosis by laboratory methods*, ed 16, Philadelphia, 1979, Saunders.

2179 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Cohen HT, Spiegel DM:

Air-exposed urine dipsticks give false-positive results for glucose and false-negative results for blood, *Am J Clin Pathol* 96:398-400, 1991.

2180 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Zweiss MH, Jackson A:

Ascorbic acid interference in reagent-strip reactions for assay of urinary glucose and hemoglobin, *Clin Chem* 32:674-677, 1986.

2181 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Bradley M, Schumann GB, Ward PCJ:

Examination of urine. In Henry JB, editor: Todd-Sanford *clinical diagnosis by laboratory methods*, ed 16, Philadelphia, 1979, Saunders.

Schweitzer SC, Schumann JL, Schumann GB:

Quality assurance guidelines for the urinalysis laboratory, *J Med Technol* 2:567-572, 1986.

2182 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Kunin CM:

Detection, prevention and management of urinary tract infections, ed 2, Philadelphia, 1974, Lea & Febiger.

2183 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Monte-Verde D, Nosanchuk JS:

The sensitivity and specificity of nitrite testing for bacteriuria, *Lab Med* 12:755-757, 1981.

2184 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Shenoy UA:

Current assessment of microhematuria and leukocyturia, *Clin Lab Med* 5:317-329, 1985.

Avent J, Schumann GB, Vars L:

Comparison of the Chemstrip leukocyte test with a standardized Papanicolaou-stained urine sediment evaluation, *Lab Med* 14:163-166, 1983.

2185 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Race GJ, White MG:

Basic urinalysis, Hagerstown, Md., 1979, Harper & Row.

2186 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Schumann GB:

Urine sediment examination, Baltimore, 1980, Williams & Wilkins.



2187 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Kunin CM:

Detection, prevention and management of urinary tract infections, ed 2, Philadelphia, 1974, Lea & Febiger.

Schumann GB, Greenberg NF:

Usefulness of microscopic urinalysis as a screening procedure: a preliminary report, *Am J Clin Pathol* 71:452-456, 1979.

2188 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Ferris JA:

Comparison and standardization of the urine microscopic examination, *Lab Med* 14:659-662, 1983.

2189 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Schumann GB, Tebbs RD:

Comparison of slides used for standardized routine microscopic urinalysis, *J Med Technol* 3:54-58, 1986.

2190 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Winkel P, Statland BE, Jörgensen K:

Urine microscopy: an ill-defined method examined by a multifactorial technique, *Clin Chem* 20:436-439, 1974.

2191 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Schumann GB, Schumann JL, Marcussen N:

Cytodiagnostic urinalysis of renal and lower urinary tract disorders, New York, 1995, Igaku-Shoin.

Schumann GB, Weiss MA:

Atlas of renal and urinary tract cytology and its histopathologic bases, Philadelphia, 1981, Lippincott.

2192 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Kennedy TJ, McConnell JD, Thall ER:

Urine dipstick vs. microscopic urinalysis in the evaluation of abdominal trauma, *J Trauma* 28:615-617, 1988.

Eggensberger DL, King C, Gaudette LE, et al: Cytodiagnostic urinalysis: three year experience with a new laboratory test, *Am J Clin Pathol* 91:202-206, 1989.

2193 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Schumann GB, Tebbs RD:

Comparison of slides used for standardized routine microscopic urinalysis, *J Med Technol* 3:54-58, 1986.

2194 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Kesson AM, Talbott JM, Gyory AZ: Microscopic examination of urine, *Lancet* 2:809-812, 1978.

2195 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Roe CE, Carlson DA, Daigneault RW, Statland BE: Evaluation of the Yellow IRIS\T: an automated method for urinalysis, *Am J Clin Pathol* 86:661-665, 1986.

2196 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Elin RJ, Hosseini JM, Kestner J, et al:

Comparison of automated and manual methods for urinalysis, *Am J Clin Pathol* 86:731-737, 1986.

2197 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Eggensberger DL, King C, Gaudette LE, et al:

Cytodiagnostic urinalysis: three year experience with a new laboratory test, *Am J Clin Pathol* 91:202-206, 1989.

Schumann GB, Schumann JL, Marcussen N:

Cytodiagnostic urinalysis of renal and lower urinary tract disorders, New York, 1995, Igaku-Shoin.



2198 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Schumann GB, Weiss MA:

Atlas of renal and urinary tract cytology and its histopathologic bases, Philadelphia, 1981, Lippincott.

2199 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Schumann GB:

Urine sediment examination, Baltimore, 1980, Williams & Wilkins.

2200 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Free AH, Free MA:

Rapid convenience urine tests: their use and misuse, *Lab Med* 9:9-17, 1978.

Schumann GB:

Urine sediment examination, Baltimore, 1980, Williams & Wilkins.

2201 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Kuster S, Ritz E:

Fragmentocytes in the diagnosis of renal hematuria -observations in the 19th century, *Nephrol Dial Transplant* 9:569-570, 1994.

Kohler H, Wandel E, Brunck B:

Acanthocyturia\Ma characteristic marker for glomerular bleeding, *Kidney Int* 40:115-120, 1991.

2202 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Little PJ:

A comparison of the urinary white cell concentration with the white cell excretion rate, *Br J Urol* 36:360-363, 1964.

2203 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Schumann GB, Schumann JL, Marcussen N:

Cytodiagnostic urinalysis of renal and lower urinary tract disorders, New York, 1995, Igaku-Shoin.

Schumann GB, Weiss MA:

Atlas of renal and urinary tract cytology and its histopathologic bases, Philadelphia, 1981, Lippincott.

2204 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Schweitzer SC, Schumann JL, Schumann GB:

Quality assurance guidelines for the urinalysis laboratory, *J Med Technol* 2:567-572, 1986.

2205 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Schumann GB, Schumann JL, Schweitzer S: Coordinated approach to the urine sediment examination, *Lab Management* 1:45-48, 1983.

2206 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Schweitzer SC, Schumann JL, Schumann GB:

Quality assurance guidelines for the urinalysis laboratory, *J Med Technol* 2:567-572, 1986.

2207 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Kesson AM, Talbott JM, Gyory AZ: Microscopic examination of urine, *Lancet* 2:809-812, 1978.

2208 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Kunin CM:

Detection, prevention and management of urinary tract infections, ed 2, Philadelphia, 1974, Lea & Febiger.

2209 (Ventana-emergente - Ventana-emergente)

Schweitzer SC, Schumann JL, Schumann GB: A model for educating future urine technologists, *J Med Technol* 2:251-255, 1986.